

**Anaerobe *O*-Demethylierung in
Acetobacterium dehalogenans:**

**Untersuchungen zu den etherspaltenden
Methyltransferasen I – Zinkbindung und Substratspezifität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Sandra Kreher

geboren am 13.06.1981 in Schlema

1. Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Diekert

2. Gutachter: Prof. Dr. Erika Kothe

3. Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller

Tag der öffentlichen Disputation: 11.12.2009

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	II
Zusammenfassung	IV
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Mikroorganismen	9
2.2. Gase und Chemikalien	10
2.3. Kultivierung der Organismen	10
2.4. Zellernte und Rohextraktherstellung	12
2.5. Molekularbiologische Methoden	13
2.6. Proteinreinigung	23
2.7. Aktivitätsmessung	27
2.8. Analytische Methoden	29
2.9. Proteinbiochemische Methoden	29
2.10. Sonstige Methoden	31
3. Ergebnisse	33
3.1. Charakterisierung der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase	33
3.1.1. Substratspektrum von nativer und rekombinanter MT I _{van} und MT I _{ver}	34
3.1.2. Metall-Kofaktoren der Methyltransferase I	36
3.1.3. <i>In silico</i> -Analysen der Methyltransferase I-Gene	41
3.2. Identifizierung der Zinkbindemotive von MT I _{ver} und MT I _{van}	43
3.2.1. PCR-Strategie zur Erzeugung von Punktmutanten	43
3.2.2. Zinkbindemotiv der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase	47
3.2.3. Zinkbindemotiv der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase	53
3.3. Erzeugung und Charakterisierung von Deletionsmutanten	57
3.3.1. Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase	57
3.3.2. Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase	67
4. Diskussion	70
5. Literatur	85
Anhang	

Abkürzungen

2-Chloranisol	1-Methoxy-2-Chlorbenzen
3-Hydroxyanisol	3-Methoxyphenol
AA	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	Bisacrylamid
CoA	Coenzym A
CV	column volume
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FH ₄	Tetrahydrofolat
Guajakol	2-Methoxyphenol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Isovanillat	3-Hydroxy-4-Methoxybenzoat
LB	Luria-Bertani
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	4-(2-Pyridylazo)-Resorcinol
PBST	Phosphate Buffered saline tween
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Syringat	3, 5-Dimethoxy-4-Hydroxybenzoat
TAE	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volume per volume
Vanillat	3-Methoxy-4-Hydroxybenzoat
Veratrol	1, 2- Dimethoxybenzen
w/v	weight per volume
X-Phosphat	5-Blau-4-chlor-3-indoxylphosphat- <i>p</i> -Toluidinsalz

Themenspezifische Abkürzungen:

AE	Aktivierendes Enzym
CP	Corrinoidprotein
MetE	Cobalamin-unabhängige Methioninsynthase von <i>Escherichia coli</i>
MetH	Cobalamin-abhängige Methioninsynthase von <i>Escherichia coli</i>
MT	Methyltransferase
MtaB	Methanol-5-Hydroxybenzimidazolylcobamid-Methyltransferase von <i>Methanosarcina barkeri</i>
van/ver	kennzeichnet die Proteinkomponente als Bestandteil der Vanillat- oder Veratrol-O-Demethylase

Zusammenfassung

Acetobacterium dehalogenans, ein gram-positiver, strikt anaerober Mikroorganismus kann methoxylierte Substrate wie Phenylmethylether als alleinige Wachstums substrate nutzen. Die Methylgruppe dieser Verbindungen wird über den methylotrophen Stoffwechselweg zu Acetat umgesetzt. Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselweges sind substrat-induzierte O-Demethylasen, welche die Übertragung der Methylgruppe auf Tetrahydrofolat katalysieren. Die O-Demethylasen bestehen aus zwei Methyltransferasen (MT I und MT II), einem Corrinoidprotein und dem Aktivierenden Enzym. Die Etherspaltung und die Übertragung der Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoidprotein - die eigentliche substratspezifische Reaktion - erfolgt durch die Methyltransferase I.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Methyltransferasen I der Vanillat- und der Veratrol-O-Demethylase ein Zinkgehalt von 1 mol Zink pro mol Protein bestimmt. Die Enzymaktivität beider Methyltransferasen I wurde durch die Inkubation mit zusätzlichem Zink um den Faktor 2 erhöht. Der Zusatz des Metallchelators EDTA (1 mM) führte zu einem vollständig inaktiven Enzym. Diese Inaktivierung konnte durch den Zusatz von 1 mM Zink aufgehoben werden. Für beide Methyltransferasen I konnten die Zinkbindemotive identifiziert werden: E-X₁₅-E-X₂₁-H für MT I_{van} und D-X₂₈-C-X₄₀-C für MT I_{ver}. Beide Bindemotive sind neuartig und unterscheiden sich von allen bisher publizierten Bindemotiven von Zinkenzymen.

Die mittels Strukturvorhersagen prognostizierten Sekundärstrukturen der beiden Methyltransferasen I zeigten eine TIM-Barrel-Struktur am C-Terminus des Proteins und einen stark variablen N-Terminus, der sich bei den beiden Enzymen deutlich unterschied. Die schrittweise Verkürzung des N-Terminus der Methyltransferasen I erzeugte Mutanten, deren spezifische Enzymaktivitäten deutlich erhöht und deren Substratspektren vergrößert wurden. Die Entfernung von 20% (MT I_{ver} 1d60) beziehungsweise 25% (MT I_{van} 1d87) der Aminosäuren der Methyltransferasen I erzeugte Enzyme, deren Aktivität um den Faktor 10 (MT I_{ver} 1d60) oder um den Faktor 20 (MT I_{van} 1d87) gesteigert wurde. Beide Mutanten zeigten keine Einschränkung ihres Substratspektrums hinsichtlich der Position der Substituenten am Aromaten. Auch nichtaromatische methylierte Verbindungen, Ethylether oder Thioether wurden von den verkürzten Enzymen als Substrat genutzt. Durch die Beseitigung des variablen N-Terminus wurden Enzyme erzeugt, deren Substratspektren sich nahezu völlig gleichen. Durch die Charakterisierung unterschiedlicher Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren am N-Terminus beziehungsweise die strukturelle Organisation dieses Enzymbereichs die Substratspezifität der Methyltransferasen bedingt.

Summary

Acetobacterium dehalogenans, a gram positive strictly anaerobic microorganism is able to utilize methoxylated substrates like phenyl methyl ethers as growth substrates. The methyl group of these substrates is converted to acetate using the methylotrophic pathway. The key enzymes of this metabolic pathway are the substrate-induced *O*-demethylases which catalyze the transfer of the methyl group to tetrahydrofolate. The *O*-demethylases consist of two methyltransferases (MT I and MT II), a corrinoid protein and the activating enzyme. The ether cleavage and the transfer of the methyl group from the substrate to the corrinoid protein are catalyzed by the methyltransferase I.

In this work, the methyltransferases I of the vanillate- and veratrol-*O*-demethylase were found to contain 1 mol zinc per mol protein. The enzyme activities of both methyltransferases I were increased by a factor of two by incubation with additional zinc. EDTA (1 mM) as metal chelator caused a total loss of the enzyme activity. The activity could be restored by the addition of zinc (1 mM). For both enzymes, the zinc binding motifs were identified: E-X₁₅-E-X₂₁-H for MT I_{van} and D-X₂₈-C-X₄₀-C for MT I_{ver}. These binding motifs are unique and differ from the motifs described for other zinc enzymes.

The secondary structures obtained from structure prediction show a TIM-barrel structure at the C-terminus of both methyltransferases I. The N-terminus of the proteins differs significantly from each other. The deletion of the N-terminus resulted in mutants with increased enzyme activities and larger substrate spectra. The deletion of 20% (MT I_{ver} 1d60) or 25% (MT I_{van} 1d87) of the amino acids caused in enzyme activities increased by a factor of 10 (MT I_{ver} 1d60) or 20 (MT I_{van} 1d87) in comparison to the unmutated enzymes. Both deletion mutants show no specificities towards the position of the substituents of the phenyl methyl ethers. Small non-aromatic methyl substrates, ethyl ether or thioether could also be converted. The deletion of the N-terminus resulted in enzymes which show nearly the same substrate specificities. The characterization of the deletion mutants of the methyltransferases I of the vanillate- and veratrol-*O*-demethylase led to the conclusion that the substrate specificities of the methyltransferases I is determined by the amino acids or the structural organization of the N-terminus.

1. Einleitung

Acetogene Bakterien, zu denen auch *Acetobacterium dehalogenans* gehört, sind in der Lage unter anaeroben Bedingungen Acetat unter Nutzung des reduktiven Acetyl-CoA-Weges aus CO_2 und H_2 zu synthetisieren und die Acetogenese mit Wachstum zu koppeln (Müller 2003). Vertreter dieser Organismen sind phylogenetisch in verschiedenen Gattungen wie *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Eubacterium*, *Moorella*, *Sporomusa* und *Holophaga* zu finden (Drake et al. 2006). Das zentrale Intermediat des acetogenen Stoffwechsels stellt dabei Acetyl-CoA dar, welches aus zwei Molekülen CO_2 gebildet wird. Ein Molekül CO_2 wird für die Synthese der Methylgruppe des Acetats stufenweise unter Verbrauch von 6 Reduktionsäquivalenten reduziert (Abb. 1-1), wobei die C_1 -Intermediate an Tetrahydrofolat gebunden sind. Das zweite Molekül CO_2 wird enzymgebunden unter Verbrauch von 2 Reduktionsäquivalenten durch die anaerobe Kohlenmonoxid-Dehydrogenase zur Carbonylgruppe reduziert (Abb. 1-1). Dasselbe Enzym

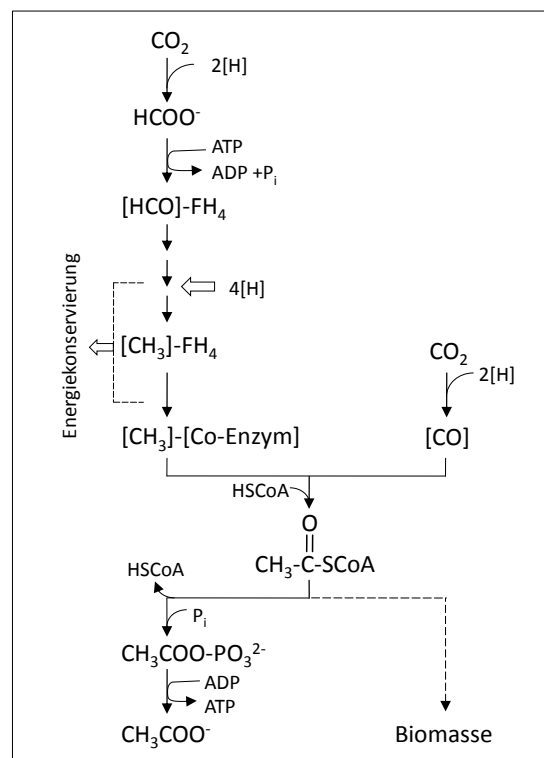


Abb. 1-1: Reduktiver Acetyl-CoA-Weg acetogener Bakterien (modifizierte und vereinfachte Darstellung, nach Drake et al. 2006). [H]: Reduktionsäquivalente; FH_4 : Tetrahydrofolat.

katalysiert die Synthese von Acetyl-CoA aus der Methyl- und der Carbonylgruppe unter Anlagerung von Coenzym A. Dieses namensgebende Intermediat des Stoffwechselweges wird anschließend entweder unter ATP-Bildung zu Acetat umgesetzt oder für den Aufbau von

Biomasse im Baustoffwechsel genutzt (Drake et al. 2006). Da bei der Synthese der Methylgruppe ein ATP verbraucht wird, also Netto kein ATP über Substratstufenphosphorylierung synthetisiert wird, gewinnen chemolithoautotrophe Acetogene ihre Energie über Elektronentransportphosphorylierung (Müller 2003). Die Energiekonservierung kann dabei über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Ein Teil der acetogenen Bakterien nutzt einen Protonengradienten zum Energiegewinn, die zweite Gruppe hingegen gewinnt über einen Natriumgradienten Energie (Müller 2003).

Acetogene Bakterien zeichnen sich im Allgemeinen durch ein breites Substratspektrum aus. Von diesen Organismen können Substrate wie verschiedene Zucker (Glukose, Fruktose; Drake et al. 2006), Alkohole und deren Derivate wie Ethanol (Eichler und Schink 1984) oder 2-Methoxyethanol (Tanaka und Pfennig 1988) oder aber organische Säuren wie Formiat (Kerby et al. 1987), Pyruvat (Drake et al. 1981), Oxalat oder Glyoxalat (Daniel und Drake 1993) genutzt werden. Einige Vertreter der acetogenen Bakterien können auch methoxylierte Aromaten wie Phenylmethylether, die beim Ligninabbau entstehen, als Wachstumssubstrate zu nutzen (Abb. 1-2). Diese methylotrophen acetogenen Bakterien wie *Acetobacterium woodii* (Bache und Pfennig 1981), *Acetobacterium dehalogenans* (Traunecker et al. 1991, Kaufmann et al. 1997),

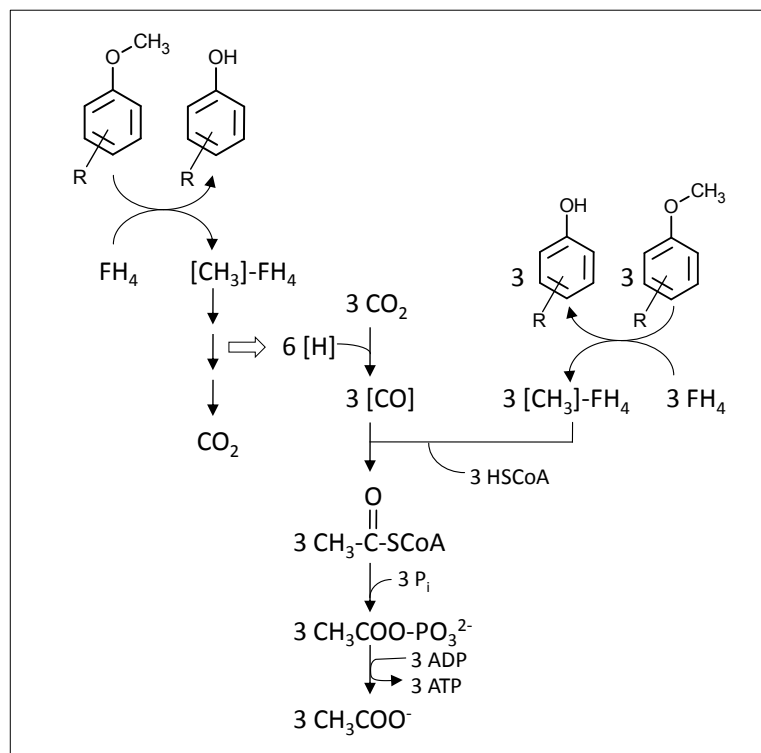


Abb. 1-2: Methylotropher Stoffwechsel von *Acetobacterium dehalogenans* (modifizierte und vereinfachte Darstellung, nach Drake et al. 2006). [H]: Reduktionsäquivalente; FH₄: Tetrahydrofolat.

Moorella thermoacetica (Daniel et al. 1991, Kasmi et al. 1994), *Holophaga foetida* (Kreft und Schink 1997) sowie *Sporomusa ovata* (Stupperich et al. 1996) nutzen dabei lediglich die über Etherbindungen gebundenen Methylgruppen als Substrat. Schlüsselenzyme dieses Stoffwechselweges sind die O-Demethylase-Systeme, welche die Etherspaltung und die Übertragung der Methylgruppe vom methoxylierten Substrat auf Tetrahydrofolat katalysieren. Auch nichtaromatische methylierte Verbindungen wie Methylchlorid (Traunecker et al. 1991, Studer et al. 2001) oder Methanol (Zeikus et al. 1980) können von einigen methylophilen Organismen genutzt werden.

Acetobacterium dehalogenans kann sowohl einfache methylierte Verbindungen wie Methylchlorid als auch methoxylierte Aromaten als Substratquellen nutzen, wobei nur die Methylgruppen dieser Substrate im acetogenen Stoffwechsel verwertet wird. Der Organismus wurde aus anaerobem Klärschlamm (Traunecker et al. 1991) mit Methylchlorid als Energiesubstrat isoliert. Der Organismus wurde zunächst als „Stamm MC“ bezeichnet. Nach 16S rDNA Analysen erfolgte die Zuordnung zur Gattung *Acetobacterium* (Kaufmann et al. 1997). Es handelt sich um ein strikt anaerobes, gram-positives Bakterium mit niedrigem GC-Gehalt.

Das Schlüsselenzym, welches die Spaltung der Etherbindung und die nachfolgende Oxidation der Methylgruppe ermöglicht, ist die O-Demethylase. Dieser Enzymkomplex katalysiert die Etherspaltung und die Übertragung der Methylgruppe vom methoxylierten Substrat auf Tetrahydrofolat. Für *Acetobacterium dehalogenans* sind bisher zwei verschiedene O-Demethylase-Systeme beschrieben (Kaufmann et al. 1997, Engelmann et al. 2001), deren Proteinkomponenten gereinigt und teilweise auch charakterisiert worden sind. Die beiden O-Demethylasen werden bei der Kultivierung auf verschiedenen Substraten induziert: die Vanillat-O-Demethylase durch Vanillat oder Syringat und die Veratrol-O-Demethylase durch 3-Hydroxyanisol. Obwohl die O-Demethylierung auch bei anderen Acetogenen beschrieben ist, wurde mit Ausnahme der Vanillat-O-Demethylase von *Moorella thermoacetica* (Naidu und Ragsdale 2001) kein weiteres O-Demethylase-System näher charakterisiert.

Beide bekannten O-Demethylasen von *A. dehalogenans* bestehen jeweils aus zwei Methyltransferasen, einem Corrinoideprotein und dem Aktivierenden Enzym. Beide O-Demethylase-Systeme sind identisch aufgebaut. Die Methyltransferase I katalysiert in der ersten Reaktion die Etherspaltung und die Übertragung der Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoideprotein (Abb. 1-3). Der Cobalt-Cofaktor des Corrinoideproteins muss dabei in der superreduzierten Cob(I)alamin-Form vorliegen. Das methylierte Corrinoideprotein wird durch die Methyltransferase II demethyliert und die Methylgruppe auf Tetrahydrofolat übertragen

(Abb. 1-3). Die Methylgruppe von Methyltetrahydrofolat wird anschließend im methylotropen Stoffwechsel oxidiert (Abb. 1-2). Das demethylierte Corrinoideprotein liegt wieder in der superreduzierten Cob(I)alamin-Form vor und kann erneut als Methylgruppenakzeptor fungieren. Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials des Cob(II)/Cob(I) Paares von ≤ -550 mV (Siebert et al. 2005) ist das superreduzierte Cobalamin sehr leicht oxidierbar. Durch die Autoxidation gibt das Corrinoideprotein ein Elektron ab und liegt in der inaktiven Cob(II)alamin-Form vor. Durch das Aktivierende Enzym wird das inaktive Cobalamin unter Verbrauch von ATP und einem Elektron in seine superreduzierte Form überführt und steht wieder als Methylgruppenakzeptor zur Verfügung.

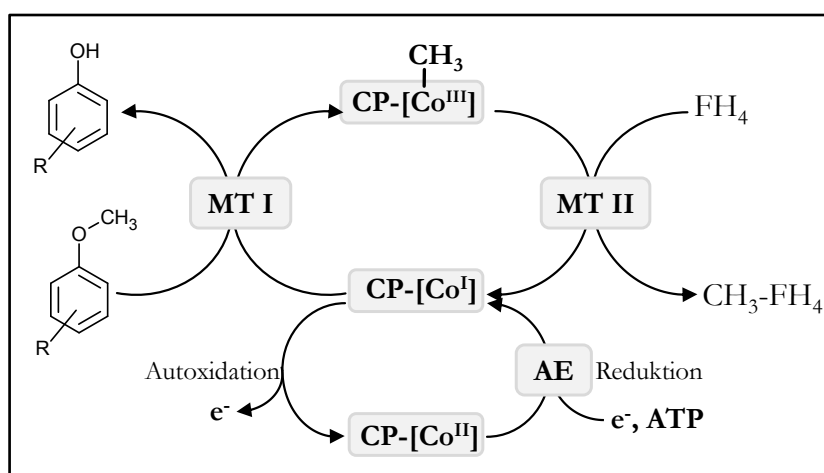


Abb. 1-3: O-Demethylierung von Phenylmethylethern durch *A. dehalogenans*. Die beteiligten Komponenten der O-Demethylase sind grau unterlegt. MT I: Methyltransferase I; MT II: Methyltransferase II; AE: Aktivierendes Enzym; CP-[Co]: Corrinoideprotein mit dem Cobalt-Cofaktor in verschiedenen Oxidationsstufen; FH₄: Tetrahydrofolat.

Die Gene der Methyltransferase I, des Corrinoideproteins und der Methyltransferase II der Veratrol- und Vanillat-O-Demethylase liegen jeweils auf einem eigenen Operon und sind identisch organisiert (Abb. 1-4). Während die Methyltransferasen II (80%) und die Corrinoideproteine (75%) hohe Sequenzhomologien aufweisen, unterscheiden sich die beiden Methyltransferasen I (22%) deutlich voneinander. Aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologien können die Corrinoideproteine und die Methyltransferasen II in der jeweiligen O-Demethylase-Reaktion gegeneinander ausgetauscht werden und katalysieren ihre spezifische Reaktion auch im anderen O-Demethylase-System (Schilhabel, Studenik et al. 2009). Sowohl die MT I der Vanillat- als auch die MT I der Veratrol-O-Demethylase können dabei das Corrinoideprotein des jeweiligen anderen O-Demethylase-Systems methylieren. Sie unterscheiden sich jedoch bezüglich des zu demethylierenden Substrates (Kaufmann et al. 1998, Engelmann et al. 2001) und bestimmen so die Substratspezifität des gesamten O-Demethylase-Komplexes. Beide Methyltransferasen I

wurden erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert und katalysieren auch als rekombinante Enzyme ihre spezifische Reaktion (Schilhabel, Studenik et al. 2009). Es konnte zudem gezeigt werden, dass beide Enzyme auch das rekombinante, mit dem Corrinoïd-Kofaktor rekonstituierte Corrinoïdprotein methylierten, wobei auch das Corrinoïdprotein des jeweils anderen O-Demethylase-Systems als Methylgruppenakzeptor fungieren konnte (Studenik 2008). Das Aktivierende Enzym liegt nur in einer Kopie im Genom vor (Schilhabel, Studenik et al. 2009), so dass es sich wahrscheinlich um ein universelles Enzym handelt, das für beide O-Demethylasen dieselbe Funktion übernimmt. Das Gen für das Aktivierende Enzym liegt auf einen eigenen Operon, welches sich nicht in der Nähe der beiden genannten O-Demethylase-Operone befindet. Durch die Untersuchung der Operonstruktur des Aktivierenden Enzyms (Schilhabel, Studenik et al. 2009) konnte ein drittes O-Demethylase-Operon identifiziert werden. Dieses Operon, bestehend aus MT I, MT II und einem Corrinoïdprotein, befindet sich 3 kb stromabwärts vom Aktivierenden Enzym. Die Methyltransferase I dieser neuen O-Demethylase wurde in *E. coli* exprimiert und teilweise charakterisiert (Lange 2009).

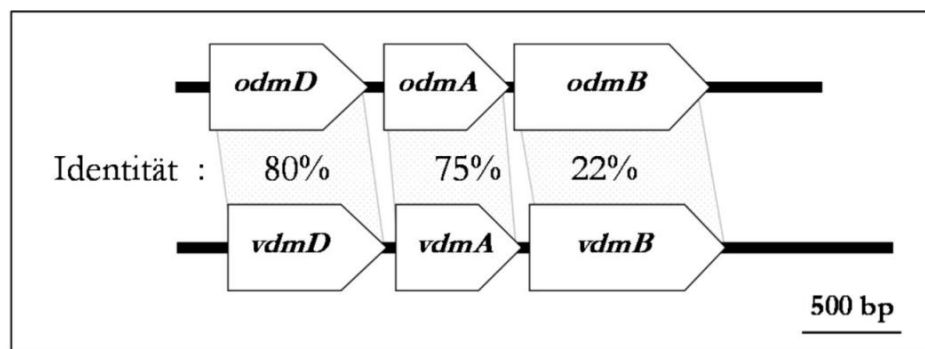


Abb. 1-4: Organisation des Vanillat- (*odm*) und des Veratrol- (*vdm*) O-Demethylase Operons von *A. dehalogenans*. Genetischer Aufbau des Vanillat- (*odm*; NCBI Acc. Nummer AF087018) und des Veratrol- (*vdm*; NCBI Acc. Nummer AY318856) Operons. *odmD/vdmD*: Methyltransferase II-Gene; *odmA/vdmA*: Corrinoïdprotein-Gene; *odmB/vdmB*: Methyltransferase I-Gene.

Im Rahmen der Reinigung und der Charakterisierung der Veratrol-O-Demethylase aus *A. dehalogenans* konnte für die MT I der Veratrol-O-Demethylase ein Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein nachgewiesen werden (Engelmann 2002). Auch andere Alkyltransferasen, die eine ähnliche Funktion übernehmen, wie die Methanol-Cobalamin Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* (Sauer und Thauer 1999) oder die Methionin-Synthasen von *Escherichia coli* (González et al. 1996, Goulding und Matthews 1997), wurden als Zinkenzyme beschrieben. Zink ist eines der am häufigsten in Enzymen vorkommenden Metalle und übernimmt eine wichtige Rolle bei der Katalyse biochemischer Reaktionen (katalytisch oder cokatalytisch) beziehungsweise bei der Aufrechterhaltung von Enzymstrukturen (Ebert und

Altman 2008). Zusätzlich kann es Einfluss auf die Quartärstruktur des Proteins nehmen, indem es die Bildung von Di- oder Trimeren durch die Bindung von Liganden an der Proteinoberfläche vermittelt (Auld 2001). Aufgrund dieser Vielzahl von möglichen Funktionen findet man Zink in allen Enzymklassen (Vallee und Auld 1990 b) bei über 300 Enzymen (Vallee und Auld 1990 a). Die Zinkbindung wird dabei durch die Seitenketten der vier Aminosäuren Histidin, Cystein, Aspartat oder Glutamat (Vallee und Auld 1990 b) vermittelt. Die Anzahl und Art der Liganden hängt von der Funktion des Zinks im Enzym ab. Bei einer strukturellen Rolle des Metalls wird Zink über vier Liganden gebunden, wobei die Bindung in den meisten Fällen durch Cysteinreste (Auld 2001) erfolgt. Bei einer strukturellen Funktion sind Aspartat oder Glutamat nur selten an der Bindung des Zinks beteiligt (Auld 2001). In Enzymen, bei denen Zink eine kokatalytische Funktion einnimmt, sind zwei oder mehr Zinkatome in unmittelbarer Nähe zueinander im Protein gebunden und übernehmen gemeinsam die katalytische Funktion (Vallee und Auld 1993). Die Zinkbindung erfolgt hauptsächlich über Aspartat-, selten über Histidin- oder Glutamat-Seitenketten, wobei eine Aminosäure beide Zinkatome bindet und sie als Brücke verknüpft (Vallee und Auld 1993). Bei einer kokatalytischen Funktion des Zinks fungiert Cystein nie als Bindepartner (Auld 2001). Übernimmt Zink eine katalytische Funktion, wird das Metall über drei Aminosäureliganden gebunden, der vierte Bindepartner ist ein Wassermolekül (Auld 2001). Zink ist bei einer katalytischen Funktion meist über Histidin, Glutamat oder Aspartat, selten über Cystein-Seitenketten gebunden (Auld 2001). Eine Ausnahme bilden dabei die Alkyltransferasen, bei denen sehr häufig Cystein als Zinkligand fungiert (Tab. 1-1). Die Abstände zwischen den

Tab. 1-1: Bindemotive zinkhaltiger Alkyltransferasen

Enzym	Zinkbindemotiv	Referenz
Cobalamin-abhängige Methioninsynthase <i>E. coli</i>	Cys247-X ₆₃ -Cys310-Cys311	Peariso et al. 1998
Cobalamin-unabhängige Methioninsynthase <i>E. coli</i>	His641-X-Cys643-X ₈₃ -Cys726	Zhou et al. 1999
Methanol-Cobalamin Methyltransferase B <i>M. barkeri</i>	Glu164-X ₅₆ -Cys220-X ₄₉ -Cys269	Hagemeier et al. 2006
Protein-Farnesyltransferase	Asp297-X-Cys299-X ₆₃ -His362	Park et al. 1997

einzelnen Proteinliganden des Zinks sind dabei recht konserviert. Zwei Bindepartner sind nur durch einen geringen Abstand von 1- 3 Aminosäuren voneinander getrennt, der Abstand zum dritten Liganden variiert stärker und kann 20 bis 120 Aminosäuren umfassen (Vallee und

Auld 1990 b). Durch die große Kombinationsvielfalt ergeben sich unterschiedlichste Bindemotive für die einzelnen Enzyme, so dass kein einheitliches Bindemotiv beschrieben ist. Auch die Zinkbindemotive verschiedener Alkyltransferasen, die ähnliche Reaktionen katalysieren wie die Methyltransferasen I von *A. dehalogenans*, nämlich den nukleophilen Angriff auf Alkylgruppen (Hightower und Fierke 1999), weisen unterschiedliche Bindemotive auf. Bei der Protein-Farnesyltransferase, welche ein Farnesyl-Isoprenoid auf ein konserviertes Cystein eines Proteins überträgt (Huang et al. 1997), besteht das Zinkbindemotiv aus einem Aspartat-, einem Cystein- und einem Histidinrest (Tab. 1-1). Aspartat und Cystein sind durch eine Aminosäure getrennt, die Distanz zum Histidin beträgt 63 Aminosäuren (Park et al. 1997). Die zwei Methioninsynthasen von *E. coli*, die Cobalamin-abhängige und die Cobalamin-unabhängige Methioninsynthase, katalysieren beide die Übertragung einer Methylgruppe von Methyltetrahydrofolat auf Homocystein unter Bildung von Methionin (Peariso et al. 1998). Die Cobalamin-abhängige Methioninsynthase besteht aus 1227 Aminosäuren und gliedert sich in vier Module, die unterschiedliche Aufgaben während der Synthese von Methionin übernehmen (Banerjee et al. 1989, Drummond et al. 1993, Goulding und Matthews 1997). Das erste Modul von 353 Aminosäuren, in dem das Zink gebunden ist, vermittelt die Bindung von Homocystein und den Methyltransfer (Matthews 2001). Das Zinkbindemotiv besteht aus drei Cysteinresten, wobei das erste Cystein 63 Aminosäuren von den beiden anderen Liganden, die direkt benachbart sind, entfernt ist (Tab. 1-1, Peariso et al. 1998). Die Cobalamin-unabhängige Methioninsynthase weist ein ähnliches Zinkbindemotiv auf, jedoch besteht das Motiv aus einem Histidin- und zwei Cysteinresten (Tab. 1-1). Das Histidin und das erste Cystein sind durch eine Aminosäure getrennt, die Distanz zum dritten Bindepartner beträgt 83 Aminosäuren (Zhou et al. 1999). Der Methyltransfer von Methanol auf Coenzym M in *Methanosarcina barkeri* wird, ähnlich wie beim O-Demethylase-System von *A. dehalogenans*, durch einen Enzymkomplex bestehend aus zwei Methyltransferasen und einem Corrinoideprotein katalysiert (Sauer und Thauer 1999). Die Methyltransferase MtaB, welche die Methylgruppe von Methanol auf das Corrinoideprotein überträgt, bildet mit dem Corrinoideprotein einen stabilen Komplex (Sauer und Thauer 1999). Die zweite Methyltransferase MtaA, die den Methylgruppentransfer vom Corrinoideprotein auf Coenzym M vermittelt, liegt hingegen als einzelnes Enzym vor (Sauer und Thauer 1999). MtaB, welche der Methyltransferase I von *A. dehalogenans* entspricht, zeichnet sich durch ein ungewöhnliches Zinkbindemotiv aus, welches keinem der beschriebenen Motive von Enzymen ähnlicher Funktion entspricht (Hagemeier et al. 2006). Die drei Zinkliganden, ein Glutamat und zwei Cysteine, sind durch etwa gleichgroße Abstände voneinander getrennt. Zwischen dem Glutamat und dem ersten Cystein liegen 56 und zwischen den beiden Cysteinen 49 Aminosäuren (Tab. 1-1; Hagemeier et al. 2006).

Die Komponenten der beiden O-Demethylasen von *Acetobacterium dehalogenans* konnten im Rahmen früherer Arbeiten identifiziert und charakterisiert werden (Kaufmann et al. 1997, Kaufmann et al. 1998, Engelmann et al. 2001). Zudem gelang es, alle Komponenten in *E. coli* heterolog zu exprimieren und die Funktionalität der rekombinanten Enzyme nachzuweisen (Schilhabel, Studenik et al. 2009), so dass nun die Voraussetzungen für eine genaue Charakterisierung der einzelnen Komponenten gegeben waren. Das Aktivierende Enzym wurde bereits eingehend charakterisiert (Studenik 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase näher untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt zunächst auf der Bestimmung der Substratspektrums und der Metall-Kofaktoren der nativen und rekombinanten Enzyme. Außerdem sollten die Zinkbindemotive der beiden Enzyme identifiziert werden, wobei ein zusätzlicher Schwerpunkt auf strukturelle Untersuchungen im Hinblick auf die Lokalisation des aktiven Zentrums und der Substratbindestellen gelegt wurde.

2. Material und Methoden

2.1. Mikroorganismen

Acetobacterium dehalogenans (DSM 11527) wurde der Stammhaltung des Institutes für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena entnommen. Die Isolierung dieses strikt anaeroben Bakteriums erfolgte aus einer Klärschlammprobe aus dem Faulturm der Kläranlage Stuttgart-Möhringen durch J. Traunecker mit Methylchlorid als Energiesubstrat (Traunecker et al. 1991). Durch 16S rDNA-Analysen wurde der als „Stamm MC“ bezeichnete Organismus der Gattung *Acetobacterium* zugeordnet (Kaufmann et al. 1997).

Für die Klonierung und die heterologe Expression der erzeugten Punkt- und Deletionsmutanten der Methyltransferasen I der Vanillat- (MT I_{van}) und Veratrol-O-Demethylase (MT I_{ver}) wurden die in Tabelle 2-1 aufgeführten *Escherichia coli*-Stämme verwendet.

Tabelle 2-1: Klonierungs- und Expressionsstämme von *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Genotyp	Funktion	Herkunft
K12 TB 1	F ⁻ <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [Φ80 <i>dlac</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15] <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>thi</i> <i>hsdR</i>	Klonierung	NEB, Frankfurt/Main
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	Expression	Stratagene, Heidelberg
BL21 (DE3) pRIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r]	Expression	Stratagene, Heidelberg
JM 109	<i>e14</i> -(<i>McrA</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>supE44 relA1 D</i> (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI</i> ^q ZDM15]	Expression	Stratagene, Heidelberg

Die unmutierten, heterolog in *Escherichia coli* exprimierten Methyltransferasen MT I_{van} und MT I_{ver} sowie die für die photometrische Messung der Methyltransferase I-Aktivität benötigten O-Demethylase-Komponenten (Corrinoidprotein und Aktivierendes Enzym) wurden von Dr. Sandra Studenik (Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Expressionstämme der *O*-Demethylase Komponenten.

Proteinkomponente	Expressionstamm
MT I_{van}	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET11a MT I_{van}
MT I_{ver}	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pRIL pET11a MT I_{ver}
Corrinoidprotein	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET11a CP _{van}
Aktivierendes Enzym	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET11d AE _{van} 11b

2.2. Gase und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Biochemikalien wurden im höchstmöglichen Reinheitsgrad von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot), Gerbu (Gaiberg), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Sigma Aldrich (Taufkirchen) und VWR (Darmstadt) bezogen. Die für die molekularbiologischen Arbeiten benötigten Enzyme und Reagenzien stammten von Fermentas (St. Leon-Rot) und Segenetic (Borken). Die Synthese des Primer (Oligonukleotide) erfolgte durch Biomers (Ulm) und Metabion (Martinsried). Stickstoff (Reinheit 5.0), Kohlendioxid (Reinheit 4.5), Wasserstoff (Reinheit 4.3), Formiergas (95% N₂, 5% H₂) und Methylchlorid (Reinheit 2.8) wurden von der Firma Linde (Leuna) bezogen.

2.3. Kultivierung der Organismen

2.3.1. *Acetobacterium dehalogenans*

Kulturmedium

Acetobacterium dehalogenans wurde unter Verwendung des von Traunecker et al. (1991) beschriebenen Mediums kultiviert (Tabelle 2-3). Einem Liter Basalmedium wurden 2 ml Spurenelementlösung (Stammlösung 500fach), 1 ml Vitaminlösung (Stammlösung 1000fach) und 0,2% (w/v) Hefeextrakt zugesetzt. Das Medium wurde mit Stickstoff anaerobisiert und vor dem Autoklavieren mit CO₂ überschichtet. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit 10 ml 5% (w/v) Cystein-HCl und 25 ml 10% (w/v) Kaliumcarbonat pro Liter versetzt. Für die Induktion der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase wurde *A. dehalogenans* mit 20 mM Syringat, für die Isolierung der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase mit 5 mM 3-Hydroxyanisol kultiviert. Für die Isolierung der genomischen DNA wurde *A. dehalogenans* auf 20 mM Fruktose kultiviert.

Tabelle 2-3: Zusammensetzung des Kulturmediums von *Acetobacterium dehalogenans*.

Bestandteil	Zusammensetzung
Basalmedium (1fach) ¹	NH ₄ Cl 1 g/l
	K ₂ HPO ₄ 0,43 g/l
	KH ₂ PO ₄ 0,076 g/l
	Na ₂ HPO ₄ 2,35 g/l
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,48 g/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,1 g/l
	Resazurin 2,5 mg/l
Spurenelementlösung (500fach) ^{1,2}	Nitrilotriessigsäure 5 g/l
	0,5 M NaOH 100 ml/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O 62 g/l
	MnSO ₄ x H ₂ O 5 g/l
	NaCl 10 g/l
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O 1 g/l
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O 1,7 g/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O 1,3 g/l
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,5 g/l
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 1,8 g/l
	AlCl ₃ x 3 H ₂ O 0,1 g/l
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 0,11 g/l
	NiCl ₂ 0,2 g/l
	Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O 21 mg/l
Vitaminlösung (1000fach) ¹	Biotin 2 mg/l
	Folsäure 2 mg/l
	Pyridoxal-HCl 10 mg/l
	Thiamin-HCl 5 mg/l
	Riboflavin 5 mg/l
	Nicotinsäure 5 mg/l
	Calciumpanthothenat 5 mg/l
	Vitamin B ₁₂ 2 mg/l
	4-Aminobenzoessäure 5 mg/l
	Liponsäure 5 mg/l

¹ Die Substanzen wurden in bidestillierten Wasser gelöst und auf 1 Liter Endvolumen aufgefüllt² Nitrilotriessigsäure wurde vor Zugabe der anderen Verbindungen in NaOH gelöst

Kultivierung

Die Zellproduktion für die Reinigung der Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* erfolgte in sechs 2 Liter-Schottflaschen mit je einem Liter Medium. Das Animpfvolumen betrug, abhängig vom Kultivierungssubstrat, 10% (Kultivierung auf Syringat) bzw. 15% (Kultivierung auf 3-Hydroxyanisol) des Kulturvolumens. *A. dehalogenans* wurde 48 h (Syringat) bzw. 120 h (3-Hydroxyanisol) unter anaeroben Bedingungen bei 28°C und 150 rpm kultiviert.

2.3.2. *Escherchia coli*

Für die Reinigung der Methyltransferase I-Mutanten wurden die entsprechenden *E. coli*-Klone aerob in 1 Liter Schikanenkolben mit 250 ml LB-Medium (5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl pro Liter) kultiviert. Nach dem Autoklavieren des Mediums wurden die entsprechenden Antibiotika sowie die Glukose zugegeben. Die Endkonzentrationen betrugen 0,1% Glukose sowie 100 µg/ml für Ampicillin und/oder 50 µg/ml für Chloramphenicol. Die Kulturbedingungen (Induktionsdauer und Temperatur) variierten entsprechend der verschiedenen *E. coli* Stämme, die die jeweiligen mutierten Methyltransferasen I exprimierten (siehe Tab. 2-8 und 2-9). Die Kultivierung der Expressionsstämme der unmutierten Methyltransferasen I, des Corrinoidproteins sowie des Aktivierenden Enzyms erfolgte wie von Studenik (2008) beschrieben. Die Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 2-4 dargestellt.

Tabelle 2-4: Kultivierungsbedingungen der O-Demethylase-Komponenten.

Komponente	Antibiotika	Temperatur	IPTG (mM)	Induktionsdauer (h)
MT I _{van}	Ampicillin	28°C	0,25	2
MT I _{ver}	Ampicillin + Chloramphenicol	28°C	0,50	2
CP _{van}	Ampicillin	37°C	0,50	1,5
AE	Ampicillin	18°C	0,50	16

2.4. Zellernte und Rohextraktherstellung

2.4.1. *Acetobacterium dehalogenans*

Die Zellen wurden in der späten logarithmischen Wachstumsphase aerob durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 10°C und 10.000 x g (Avanti-Zentrifuge, Beckmann, München) geerntet. Die Zellpellets wurden in 200 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen, in flüssigen Stickstoff gefroren

und unter Stickstoffatmosphäre bei -20°C gelagert. Für die Herstellung der Rohextrakte wurden die Zellen anaerob in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (1 ml Puffer pro Gramm Feuchtzellen) unter Zugabe von 1 mg DNase und 1 mM PMSF (Proteaseinhibitor; Sigma, Taufkirchen) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls anaerob mittels eines Hochdruck-Homogenisators (FrenchPress®, Firma G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Die Abtrennung der löslichen Fraktion von Zelltrümmern und Membranen erfolgte durch Ultrazentrifugation für 45 min bei 10°C und 120.000 x g (L8 70 M Ultrazentrifuge, Beckmann, München).

2.4.2. *Escherichia coli*

Die Zellen wurden nach ihrer jeweiligen Induktionsdauer aerob durch 15-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 10°C (Avanti-Zentrifuge, Beckmann, München) geerntet. Die Zellpellets wurden in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert (1 ml Puffer pro 1 g Feuchtzellen) und bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls mittels FrenchPress® nachdem den Zellen 1 mg DNase und 1 mM PMSF zugesetzt wurden. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und 10°C.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. DNA-Isolierung aus *Acetobacterium dehalogenans*

Die genomische DNA wurde mittels der von Bollet et al. (1991) beschriebenen Methode aus *Acetobacterium dehalogenans* gewonnen. Für die DNA-Isolierung wurden 100 ml Kultur (*A. dehalogenans* kultiviert auf 20 mM Fruktose) in der späten logarithmischen Wachstumsphase geerntet (15 min, 10°C, 10.000 x g). 200 mg Feuchtzellen wurden in 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 10.000 x g). Das Pellet wurde nachfolgend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 50 µl 10% (w/v) SDS 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Das Lysat wurde 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert und das Pellet im Anschluss 3 x 1 Minute in einem Mikrowellenherd bei 750 Watt erhitzt. Nach dem Resuspendieren des Pellets in 200 µl TE-Puffer wurde dem Ansatz 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt. Nach einer Inkubation bei 20°C und 500 rpm für 15 min erfolgte erneut eine 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g. Der wässrigen Phase wurde, nach der Überführung in ein neues Reaktionsgefäß, 400 µl 96% Ethanol zugesetzt und der Ansatz 30 min bei -20°C inkubiert, um die enthaltene DNA zu fällen. Nach der Zentrifugation (15 min, 16.000 x g) wurde das Präzipitat mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen (15 min, 55°C) in 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Um die RNA

zu entfernen, erfolgte nach der Zugabe von 0,01% (w/v) RNase eine 15-minütige Inkubation bei 37°C.

2.5.2. DNA-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA-Proben wurde eine horizontale Gelelektrophoreseanlage (Mini Sub[®] Cell GT, BioRad, München) mit einem TAE-Puffersystem (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verwendet. Die Gele enthielten 0,8 - 1,0% (w/v) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Proben wurden mit Probeladepuffer (6x Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot) im Verhältnis 1:5 versetzt und bei einer Spannung von 7 V/cm 1 h bei Raumtemperatur aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mittels einer Geldokumentationsanlage (Image Master[®] VDS, GE Healthcare, Freiburg).

2.5.3. Konstruktion von Expressionsplasmiden

Die erzeugten Punkt- und Deletionsmutanten von MT I_{van} und MT I_{ver} wurden mit Ausnahme von MT I_{van} 1d87 als C-terminale Strep-Fusionsprodukte, unter Verwendung der NdeI und BamHI Restriktionsstellen der „multiple cloning site“, in pET11a kloniert. MT I_{van} 1d87 (C-terminale Fusion mit Strep-Tag) wurde in pJOE2702 kloniert, ebenfalls unter Verwendung der NdeI- und BamHI- Restriktionsschnittstellen. Die verwendeten Primer wurden von den Operonsequenzen der MT I_{van} und MT I_{ver} abgeleitet (NCBI Acc. Nr. AF087018, AY318856).

Erzeugung von Punktmutationen mittels „Megaprimer-PCR“

MT I_{van} C286A wurde in zwei aufeinanderfolgenden Amplifikationsschritten erzeugt. Als Template diente in beiden PCR-Schritten aus *A. dehalogenans* isolierte genomische DNA. Im ersten PCR Schritt wurde mit Hilfe der Kombination der Primer C286A (5'-GTTGAAAAAACCGCTCAGGAAAATGGC-3') und 67_R (5'-TGGATCCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTGAACAATTTCTCTGACATC-3') ein mutierter Megaprimer amplifiziert. Das erzeugte Genfragment wurde gereinigt, 20 min bei 65°C denaturiert und als Reverse-Primer in die zweite PCR eingesetzt. Als Forward-Primer wurde im zweiten Amplifikationsschritt der Primer 68_F (5'-AAAACATATGTTAACAAAAAGACAGAATTTAGTGGAAGTGATGAAGGGTGG-3') eingesetzt.

PCR-Ansatz: 100 ng Template (DNA aus *A. dehalogenans*)
25 pmol je Primer / 50 ng erstes Genfragment
10 mM Tris-HCl pH 8,5
2,5 mM MgCl₂
0,2 mM je dNTP
2,5 U Taq-Polymerase

Die Amplifikation erfolgte mittels des folgenden Temperaturprogrammes:

Programm 1. PCR:

1. Denaturieren	2 min	96°C	}	35 Zyklen
2. Denaturieren	30 s	96°C		
3. Annealing	45 s	45°C		
4. Elongation	45 s	72°C		
5. Elongation	5 min	72°C		

Programm 2. PCR:

1. Denaturieren	2,5 min	96°C	}	35 Zyklen
2. Denaturieren	30 s	96°C		
3. Annealing	45 s	45°C		
4. Elongation	3 min	72°C		
5. Elongation	10 min	72°C		

Erzeugung von Punktmutationen mittels „overlap-extension-PCR“

Die Erzeugung der Punktmutanten erfolgte modifiziert nach der Methode von An et al. (2005) in drei PCR-Schritten. Als Template diente in den ersten beiden Amplifikationsschritten genomische DNA von *A. dehalogenans*. In der ersten PCR wurde das 1. Genfragment, vom 5'-Ende des Gens bis zu dem zu mutierenden Codon, amplifiziert. In der zweiten PCR wurde das 2. Genfragment, vom zu mutierenden Codon bis zum 3'-Ende des MT I-Gens, erzeugt. Im dritten Amplifikationsschritt wurden die erzeugten Fragmente als Template eingesetzt. Die Sequenzen der in die PCR eingesetzten Primer sind in den Tabellen 2-5 und 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-5: Primersequenzen für die Amplifikation der Punktmutanten von MT I_{van} .

Gen	Primernamen	Sequenz (5'...3')
$mt I_{van}$	MT I_{van} _NdeI_F	GGAGATATACATATGTTAACAAAAAGACAG
	MT I_{van} _Strep_R	CTGCGGGTGGCTCCAAGCGCAGAACAATTTCTCTG
	Strep_BamHI_R	CAGCCGGATCCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGG
$mt I_{van}$ D102A	D102A_F	GCCGTTGCTGCTGCCAATGCGGTTGA
	D102A_R	TCAACCGCATTGGCAGCAGCAACGGC
$mt I_{van}$ D107A	D107A_F	AATGCGGTTGCTCGGAATGATCAG
	D107A_R	CTGATCATTCCGAGCAACCGCATT
$mt I_{van}$ D110A	D110A_F	CGGAATGCTCAGTACGTTACGG
	D110A_R	CCGTAACGTACTGAGCATTCCG
$mt I_{van}$ E123A	E123A_F	GATAATGAACGTGTGCGAACAATCCCG
	E123A_R	GATAATGAACGTGTGCGAACAATCCCG
$mt I_{van}$ H124A	H124A_F	GTTCTGAAGCCGTTTATTATCTGATGAGC
	H124A_R	GCTCATCAGATAATGAACGGCTTCGAAC
$mt I_{van}$ H126A	H126A_F	GGATTGTTCTGAACACGTTGCTTATCTGATGAGC
	H126A_R	GCTCATCAGATAAGCAACGTGTTCTGAACAATCC
$mt I_{van}$ E132A	E132A_F	GATGAGCATGGCAGAGGCGTTAAT
	E132A_R	ATTAACGCCTCTGCCATGCTCATC
$mt I_{van}$ E133A	E133A_F	GATGAGCATGGAAGCGGCGTTAAT
	E133A_R	ATTAACGCCGCTTCCATGCTCATC
$mt I_{van}$ E140A	E140A_F	TATTATGCAGAACCAGAAGCGA
	E140A_R	TCGCTTCTGGTTCTGCATAATA
$mt I_{van}$ E141A	E141A_F	TATTATGAAGCACCAGAAGCGA
	E141A_R	TCGCTTCTGGTGCTTCATAATA
$mt I_{van}$ E143A	E143A_F	AAGAACCAGCAGCGATGCATGAA
	E143A_R	TTCATGCATCGCTGCTGGTTCTT
$mt I_{van}$ H146A	H146A_F	AAGCGATGGCTGAACTGATTGACTA
	H146A_R	TAGTCAATCTGTTTCTAGCCATCGCTT
$mt I_{van}$ E147A	E147A_F	AAGCGATGCATGCACTGATTGACTA
	E147A_R	TAGTCAATCAGTGCATGCATCGCTT
$mt I_{van}$ D150A	D150A_F	GAACTGATTGCCTACCTGGTCTGA
	D150A_R	TCGACCAGGTAGGCAATCAGTTC
$mt I_{van}$ D154A	D154A_F	TACCTGGTCGCTTTTGAAGTGGT
	D154A_R	ACGCAGTTCAAAAGCGACAGGTA
$mt I_{van}$ E156A	E156A_F	CGATTTTGCCTGCGTCTGGCCAAA
	E156A_R	TTTGGCCAGACGAGTGCAAAATCG
$mt I_{van}$ E162A	E162A_F	GGCCAAAGCGTTTATCAAGCATC
	E162A_R	GGCCAAAGCGTTTATCAAGCATC
$mt I_{van}$ H166A	H166A_F	TTATCAAGGCTCTTCATCCCGACGCGG
	H166A_R	CCGCGTCGGGATGAAGAGCCTTGATAA
$mt I_{van}$ H168A	H168A_F	GAGTTTATCAAGCATCTTGCTCCCGACGCGG
	H168A_R	CCGCGTCGGGAGCAAGATGCTTGATAAACTC

Tabelle 2-6: Primersequenzen für die Amplifikation der MT I_{ver} -Punktmutanten.

Gen	Primernamen	Sequenz (5'...3')
<i>mt I_{ver}</i>	<i>MT I_{ver}</i> _NdeI_F	GGAGATATACATATGAATCAGAGAGAG
	<i>MT I_{ver}</i> _Strep_R	CTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTAAGCTTGTATTATT CATT
<i>mt I_{ver}</i> C29A	C29A_F	AAAACCGCTGTTATGGCAACAAGT
	C29A_R	ACTTGTTGCCATAACAGCGGTTTT
<i>mt I_{ver}</i> D83A	D83A_F	CCAAATGTTGCTACACTGGGG
	D83A_R	CCCCAGTGTAGCAACATTTGG
<i>mt I_{ver}</i> E88A	E88A_F	GGGGATTGCAGAAGCTGCTAAAATGG
	E88A_R	CCATTTTAGCAGCTTCTGCAATCCCC
<i>mt I_{ver}</i> E89A	E89A_F	GGGGATTGAAGCAGCTGCTAAAATGG
	E89A_R	CCATTTTAGCAGCTGCTTCAATCCCC
<i>mt I_{ver}</i> E94A	E94A_F	GCTGCTAAAATGGCACTAGCAGATG
	E94A_R	CATCTGCTAGTGCCATTTTAGCAGC
<i>mt I_{ver}</i> D97A	D97A_F	GGAAGTAGCAGCTGTAAAACGAG
	D97A_R	CTCGTTTTACAGCTGCTAGTTCC
<i>mt I_{ver}</i> D101A	D101A_F	GATGTAAAACGAGCTGAAATGG
	D101A_R	CCATTTTACAGCTCGTTTTACATC
<i>mt I_{ver}</i> E102A	E102A_F	AAACGAGATGCAATGGTTATAAATG
	E102A_R	CATTTATAACCATTCATCTCGTTT
<i>mt I_{ver}</i> C111A	C111A_F	GTGCCGCTGGTTTGTTCGAACGAATGGC
	C111A_R	GCCATTTCGTTTGAACAAACAGCGGCAC
<i>mt I_{ver}</i> C128A	C128A_F	CACACTCGCTTCGCTGGTGAAGATCC
	C128A_R	GGATCTTCCACCAGCGAAGCGAGTGTG
<i>mt I_{ver}</i> D150A	D150A_F	CCGAATTGCTTGCCATAATCG
	D150A_R	CGATTATGGCAAGCAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> D150C_C151A	D150C_C151A_F	CCGAATTTGTGCCATAATCGAATTATC
	D150C_C151A_R	GATAATTCGATTATGGGCACAAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> C151A	C151A_F	CCGAATTGATGCCATAATCG
	C151A_R	CGATTATGGGCATCAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> C151D	C151D_F	CCGAATTGATGACCATAATCG
	C151D_R	CGATTATGGTCATCAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> H152A	H152A_F	CCGAATTGATTGCGCTAATCG
	H152A_R	CGATTAGCGCAATCAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> H152C_C151A	H152C_C151A_F	CCGAATTGATGCCTGTAATCGAATTATC
	H152C_C151A_R	GATAATTCGATTACAGGCATCAATTCGG
<i>mt I_{ver}</i> C210A	C210A_F	CTCACAACATACCGCCGAAAATGCG
	C210A_R	CGCATTTTCCGGCGGTATGTTGTGAG
<i>mt I_{ver}</i> C213A	C213A_F	GCGGAAAAGCCGAAGAAATTGTCGG
	C213A_R	CCGACAATTTCTTCGGCTTTTCCGC
<i>mt I_{ver}</i> C277A	C277A_F	GAAGCCAAACGCGCTGTCAGAGTATACGG
	C277A_R	CCGTATACTCTGACAGCGGTTTGGCTTC

Die PCR-Ansätze (Gesamtvolumen 25 µl) setzten sich wie folgt zusammen:

Ansatz PCR: 100 ng Template-DNA / 50 ng je DNA-Fragment (3. PCR)
 25 pmol je Primer
 PCR-Puffer¹
 1,5 mM MgCl₂ (MT I_{van}) / 2,5 mM MgCl₂ (MT I_{ver})
 0,2 mM je dNTP
 2,5 U Taq-Polymerase

¹ Zusammensetzung PCR-Puffer:

- MT I_{van} Mutanten: 6 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM KCl; 1,0 mM 2-Mercaptoethanol;
 0,01% Triton X-100
- MT I_{ver} Mutanten: 1,6 mM (NH₄)₂SO₄; 6,7 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,01% Tween 20

Die Amplifikation erfolgte unter Anwendung der folgenden Temperaturprogramme:

Programm 1. und 2. PCR

1. Denaturieren	2,5 min	96°C	
2. Denaturieren	1 min	96°C	
3. Annealing	30 s	50°C (MT I _{ver}) / 55°C (MT I _{van})	} 35 Zyklen
4. Elongation	1 min	72°C	
5. Elongation	15 min	72°C	

Programm 3. PCR

1. Denaturieren	2,5 min	96°C	
2. Denaturieren	30 s	96°C	} 20 Zyklen
3. Elongation	20 s	72°C	
4. Denaturieren	30 s	96°C	
5. Denaturieren	20 s	96°C	
6. Annealing	30 s	55°C (MT I _{van}) / 50°C (MT I _{ver})	} 30 Zyklen
7. Elongation	2 min	72°C	
8. Denaturieren	30 s	96°C	} 20 Zyklen
9. Elongation	1 min	72°C	
10. Elongation	15 min	72°C	

Erzeugung von Deletionsmutanten von MT I_{van} und MT I_{ver}

Die deletierten Methyltransferasen I wurden in zwei Amplifikationsschritten erzeugt. Im ersten Schritt wurde als Template genomische DNA, isoliert aus *A. debalogenans*, eingesetzt. Das gereinigte 1. PCR-Produkt diente als Template der 2. PCR. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-7 aufgeführt.

Tabelle 2-7: Primersequenzen für die Amplifikation der Deletionsmutanten von MT I_{van} und MT I_{ver}.

Gen	Primernamen	Sequenz (5'...3')
<i>mt I_{van}</i> 1d62	MT I _{van} _1d62_F	AAAACATATGTCATTCCCGATTCATGAC
	MT I _{van} _Strep_R	CTGCGGGTGGCTCCAAGCGCAGAACAATTTCTCTG
	Strep_BamHI_R	CAGCCGGATCCTTATTTTTTCGAAGTGC
<i>mt I_{van}</i> 1d70	MT I _{van} _1d70_F	GGAGATATACATATGCACATTGTCATCAAGGATA
<i>mt I_{van}</i> 1d75	MT I _{van} _1d75_F	GGAGATATACATATGGATATTACTAAATGGCGGG
<i>mt I_{van}</i> 1d80	MT I _{van} _1d80_F	GGAGATATACATATGCGGGATTATGTTAAAGCTC
<i>mt I_{van}</i> 1d87	MT I _{van} _1d87_F	AAAACATATGAATCTTGATTATCCTGATGAAGCC
<i>mt I_{van}</i> 1d89	MT I _{van} _1d89_F	AAAACATATGGATTATCCTGATGAAGCC
<i>mt I_{van}</i> 1d91	MT I _{van} _1d91_F	AAAACATATGCCTGATGAAGCCTGGGCG
<i>mt I_{van}</i> 1d97	MT I _{van} _1d97_F	AAAACATATGACGGCCGTTGCTGATGCC
<i>mt I_{van}</i> 1d108	MT I _{van} _1d108_F	AAAACATATGGGAATGATCAGTACGTTACGG
<i>mt I_{ver}</i> 1d55	MT I _{ver} _1d55_F	GGAGATATACATATGGAAGGATCAATTCCTGAA
	MT I _{ver} _Strep_R	CTGCGGGTGGCTCCAAGCGCTAAGCTTGTTTATTTTCATT
<i>mt I_{ver}</i> 1d60	MT I _{ver} _1d60_F	GGAGATATACATATGGAACCTAATAAGTTCAT
<i>mt I_{ver}</i> 1d65	MT I _{ver} _1d65_F	AAAACATATGTTTAATGACATTACCGACTGG
<i>mt I_{ver}</i> 1d80	MT I _{ver} _1d80_F	AAAACATATGAATGTTGATACACTGGGG

Die Ansätze der PCR-Reaktion (Gesamtvolumen 25 µl) setzten sich wie folgt zusammen:

PCR Ansatz:

- 100 ng Template-DNA
- 25 pmol je Primer
- PCR-Puffer¹
- 1,5 mM MgCl₂ (MT I_{van}) / 2,5 mM MgCl₂ (MT I_{ver})
- 0,2 mM je dNTP
- 2,5 U Taq-Polymerase

¹ Zusammensetzung der PCR-Puffer siehe Erzeugung von Deletionsmutanten

Die Amplifikation erfolgte mittels des folgenden Temperaturprogrammes:

Programm:

1. Denaturieren	2,5 min	96°C	
2. Denaturieren	1 min	96°C	
3. Annealing	30 s	50°C (MT I _{ver})/ 55°C (MT I _{van})	} 35 Zyklen
4. Elongation	1 min	72°C	
5. Elongation	15 min	72°C	

Ligation

Für die Ligation wurden die PCR-Fragmente im Vektor:Insert-Verhältnis von 1:10 eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 10 µl. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 45°C wurde dem Ansatz 1 U T4 Ligase zugesetzt. Die Ligation erfolgte 1 h bei 25°C. Die Reaktion wurde vor der Transformation durch 20-minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die *Escherichia coli* Stämme (siehe Tab. 2-1) wurden in SOB-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bei 578 nm kultiviert. Die Ansätze wurden 10 min auf Eis inkubiert und nachfolgend durch eine 10-minütige Zentrifugation (2.500 x g, 4°C) abgeerntet. Die Zellen wurden anschließend in 80 ml TB-Puffer (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH mit KOH auf 6,7 eingestellt; Puffer nach der Zugabe von 55 mM MnCl₂ sterilfiltriert) resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss erneut zentrifugiert (10 min, 2.500 x g, 4°C). Zu den in 20 ml TB Puffer resuspendierten Zellen wurde tropfenweise DMSO (Endkonzentration 7% (v/v)) gegeben. Der Ansatz wurde erneut 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abschließend portioniert (250 µl), in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation

Die chemisch kompetenten Zellen wurden durch Hitzeschock transformiert. Den Zellen wurde ligiertes Plasmid (Konzentration unter 100 ng) zugegeben und der Ansatz anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42°C für 40 s. Dem Ansatz wurde 250 µl LB-Medium zugegeben und anschließend 1 h bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf Agarplatten (mit 100 µg/ml⁻¹ Ampicillin) ausplattiert und bei 37°C bebrütet.

Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte modifiziert nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Für die Isolierung wurden 1,5 ml Kultur (über Nacht bei 37°C inkubiert) abzentrifugiert und in 300 µl TE-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurden 300 µl 0,2 N NaOH/1% SDS (w/v) zugegeben. Nach vorsichtigen Mischen wurde dem Ansatz 300 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 hinzugefügt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat abzentrifugiert (20 min, 16.100 x g, 10°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurden 750 µl Isopropanol zugegeben, der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (20 min, 16.100 x g, 10°C). Die gefällte Plasmid-DNA wurde mit 200 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen, 15 min bei 50°C getrocknet und im Anschluss in 30 µl bidestillierten Wasser mit 0,01% RNase (w/v) resuspendiert. Abschließend wurde die isolierte DNA 15 min bei 37°C inkubiert.

Identifizierung positiver Klone

Für die Detektion der positiven Klone wurde 5 µl der isolierten Plasmid-DNA mit 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym (BamHI, EcoRI, EcoRV; Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt (2 h, 37°C) und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrollen dienten Leervektoren.

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der identifizierten positiven Klone der jeweiligen Mutanten wurde durch die Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Programmes ClustalW (Thompson et al. 1994) analysiert.

2.5.4. Expression der mutierten Methyltransferasen I

Die Expression der Punkt- und Deletionsmutanten der MT I erfolgte, mit Ausnahme der Deletionsmutante MT I_{van} 1d87, in *E. coli* BL21 (DE3). Als Induktor wurde IPTG in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Um eine Basalexpression der mutierten Methyltransferasen I zu vermeiden, wurde sowohl den Haupt- als auch den Vorkulturen Glukose (5 bzw. 50 mM) zugesetzt. Abhängig von den jeweiligen Kulturbedingungen betrug das Animpfvolumen 1% (37°C), 5% (28°C) beziehungsweise 10% (18°C) (v/v) des Kulturvolumens. Die Zugabe des Induktors erfolgte bei einer optischen Dichte (OD_{578nm}) der Hauptkultur von 0,6. Die Induktion der Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 erfolgte in *E. coli* JM 109. Als Induktor wurde Rhamnose verwendet. Für die Kontrolle der Induktion wurde vor und nach Induktion der

jeweiligen Mutante 1 ml Kulturflüssigkeit abgenommen, 1 min bei 16.100 x g abzentrifugiert und das Pellet für 30 min bei -80°C gelagert. Nach der Zugabe von 50 µl Lysepuffer (0,2 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-HCl pH 7,5) erfolgte der Zellaufschluss bei 37°C und 1000 rpm für 1 h. Nach der Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer (10 min, 16.100 x g, 10°C) wurden die Überstände über SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die optimalen Induktionsbedingungen der MT I-Mutanten sind in den Tabellen 2-8 und 2-9 dargestellt.

Tabelle 2-8: Induktionsbedingungen der Punkt- und Deletionsmutanten der MT I_{van}.

Plasmid	Expressionsstamm	Induktion		
		IPTG (mM)	Temp. (°C)	Zeit (h)
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d62	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d70	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d75	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d80	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pJOE 2702 <i>mt I_{van}</i> 1d87	<i>E. coli</i> JM 109	0,02% ¹	37	30
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d89	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d91	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d97	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> 1d108	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> D102A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> D107A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> D110A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E123A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> H124A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> H126A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E132A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E133A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E140A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E141A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E143A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> H146A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E147A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> D150A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> D154A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E156A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> E162A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> H166A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> H168A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{van}</i> C286A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,25	28	2

¹ Rhamnose als Induktor verwendet

Tabelle 2-9: Induktionsbedingungen der Punkt- und Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase.

Plasmid	Expressionsstamm	Induktion		
		IPTG (mM)	Temp. (°C)	Zeit (h)
pET11a <i>mt I_{ver}</i> 1d55	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> 1d60	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> 1d65	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> 1d80	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C29A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> D83A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> E88A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> E89A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> E94A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> D97A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> D101A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> E102A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C111A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C128A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,50	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> D150A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> D150C_C151A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C151A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C151D	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> H152A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> H152C_C151A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C210A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,25	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C213A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,10	18	20
pET11a <i>mt I_{ver}</i> C277A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0,25	18	2

2.6. Proteinreinigung

2.6.1. Reinigung der nativen Methyltransferasen MT *I_{van}* und MT *I_{ver}*

Die Reinigung der nativen Methyltransferasen erfolgte unter anoxischen Bedingungen (95% N₂, 5% H₂) in einer Anaerobierkammer (COY Laboratory, Grass Lake, Michigan, USA) bei Raumtemperatur. Die Abtrennung der Methyltransferasen von den übrigen Proteinen erfolgte mit Hilfe einer FPLC-Anlage (Äkta-FPLC 900), welche ebenso wie die verwendeten Chromatographie-Säulen von GE Healthcare (Freiburg) bezogen wurde. Die verschiedenen Rohextrakte (MT *I_{van}*: Wachstumssubstrat Syringat, MT *I_{ver}*: Wachstumssubstrat 3-Hydroxyanisol)

wurden zunächst auf eine Q-Sepharose-Säule (16/10) aufgetragen. Die verwendeten Puffer und die Laufbedingungen sind in Tabelle 2-10 aufgeführt.

Tabelle 2-10: Chromatographiebedingungen für die Reinigung der nativen MT I.

Säule	Puffer ¹	Programm		
		Gradient	Länge Gradient	Flussrate
Q-Sepharose (16/10)	A: 50 mM MOPS pH 6,5	0 – 0,25 M KCl	5 CV ²	4 ml/min
	B: 50 mM MOPS pH 6,5; 1 M KCl	0,25 – 1 M KCl	5 CV	
		1 M KCl	3 CV	
Phenyl Superose (10/10)	A: 50 mM MOPS pH 6,5;	1,2 – 0,96 M AS	1 CV	1 ml/min
	B: 50 mM MOPS pH 6,5; 1,2 M Ammoniumsulfat	0,96- 0 M AS	6 CV	
		0 M AS	2 CV	
MonoQ (10/10)	A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5;	0 – 0,4 M KCl	5 CV	2 ml/min
	B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M KCl	0,4 – 1 M KCl	2,5 CV	

¹ alle Puffer enthielten 0,5 mM DTT. ² CV = column volume.

Die Fraktionen, die bei einer Salzkonzentration von 0,3 M KCl eluierten und die Methyltransferase I enthielten, wurden vereinigt und mit 3,6 M Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 1,2 M Ammoniumsulfat eingestellt. Die Probe wurde anschließend auf eine Phenyl-Superose-Säule (10/10) aufgetragen. Die bei einem Salzgehalt von 0,4 M Ammoniumsulfat eluierten Fraktionen, welche die MT I enthielten, wurden 1:10 mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM DTT verdünnt und in einem letzten Reinigungsschritt auf eine MonoQ-Säule (10/10) aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei jedem Reinigungsschritt über die Leitfähigkeit sowie die Absorption bei 280 nm verfolgt. Nach jeder Säule wurden die Fraktionen gelektrophoretisch aufgetrennt und die MT I-Aktivität photometrisch überprüft.

2.6.2. Reinigung und Rekonstitution des Corrinoideproteins

Für die photometrische Aktivitätsbestimmung der Methyltransferase I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase wurde das Corrinoideprotein in großen Mengen in ausreichender Konzentration benötigt. Aus diesem Grund wurde rekombinantes Corrinoideprotein der Vanillat-O-Demethylase in *E. coli* produziert (siehe Tab. 2-4) und über eine Q-Sepharose (siehe Tab. 2-9) angereichert. Da *E. coli* nicht in der Lage ist, den Corrinoide-Cofaktor Hydroxocobalamin einzubauen, erfolgte anschließend die Rekonstitution des Proteins. Abschließend wurde die Probe auf eine Mono-Q-

Säule (siehe Tab. 2-11) aufgetragen, um weiteres Fremdprotein und ungebundenes Hydroxocobalamin abzutrennen.

Reinigung des Corrinoidproteins

Sämtliche Reinigungsschritte erfolgten unter anoxischen Bedingungen unter Nutzung der FPLC-Anlage (siehe 2.6.1). Die Laufbedingungen und Puffer sind in Tabelle 2-11 zusammengefasst.

Tabelle 2-11: Chromatographiebedingungen der Reinigung des rekombinanten Corrinoidproteins der Vanillat-*O*-Demethylase.

Säule	Puffer ¹	Programm		
		Gradient	Länge Gradient	Flussrate
Q-Sepharose (10/10)	A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5	0 - 0,25 M KCl	6 CV ²	2 ml/min
	B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M KCl	0,25 - 1 M KCl	6 CV	
		1 M KCl	1,5 CV	
MonoQ (10/10)	A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5	0 - 0,4 M KCl	5 CV	2 ml/min
	B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M KCl	0,4 - 1 M KCl	2,5 CV	

¹ alle Puffer enthielten 0,5 mM DTT. ² CV = column volume.

Rekonstitution des Corrinoidproteins

Die Fraktionen der Q-Sepharosesäule, welche Corrinoidprotein enthielten, wurden unter anoxischen Bedingungen vereinigt. Dem Ansatz wurde Betain (Endkonzentration 3,4 M), DTT (1 mM), PMSF (1 mM) und im fünffachen Überschuss Hydroxocobalamin (Vitamin B_{12a}) zugegeben. Der Rekonstitutionsansatz wurde im Anschluss unter N₂ (100%) 16 h bei 4°C inkubiert. Die Proteinlösung wurde nachfolgend mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM DTT schrittweise bis auf eine Betainkonzentration von 50 - 100 mM verdünnt (4°C, 60 rpm). Der Ansatz wurde abschließend filtriert (Porengröße 0,2 µm), im Eisbad anaerobisiert und auf die Mono-Q-Säule aufgetragen.

2.6.3. Reinigung der rekombinanten unmutierten und mutierten Methyltransferasen I

Reinigung der unmutierten MT I und der Punktmutanten

Sowohl die unmutierten rekombinanten Methyltransferasen I als auch alle Punktmutanten wurden zunächst über eine Q-Sepharose (10/10) angereichert und anschließend mittels Affinitätschromatographie, bei der die Bindung des C-terminalen Strep-tag an das Säulenmaterial Strep-Tactin (*Step*-Tactin Superflow Cartridge, IBA GmbH Göttingen) genutzt wird, gereinigt.

Q-Sepharose

Die Reinigung erfolgte unter anaeroben Bedingungen unter Nutzung einer Äkta-FPLC-Anlage (siehe 2.6.1.). Als Laufpuffer dienten 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM DTT und 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM DTT und 1 M KCl. Die Flussrate betrug 2 ml/min. Die Elution erfolgte mittels eines ansteigenden KCl-Gradienten (6 Säulenvolumen 0 – 0,25 M KCl, 6 Säulenvolumen 0,25 – 1 M KCl, 1,5 Säulenvolumen 1M KCl). Die bei einer Salzkonzentration von 0,20 - 0,25 M KCl eluierenden Methyltransferase I-Fractionen wurden vereinigt und mittels Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

Affinitätschromatographie

Das Reinigungsprinzip beruht auf die spezifische Bindung von Biotin an Streptavidin. Als stationäre Phase wurde dabei ein modifiziertes Streptavidin, das Strep-Tactin, welches an das Q-Sepharose-Säulenmaterial gebunden ist, verwendet. Durch den an die Proteine fusionierten C-terminalen Strep-tag konnte diese Biotinbindestelle am Strep-Tactin besetzt werden, wodurch eine spezifische Reinigung erzielt wurde. Die Reinigung erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Elution erfolgte über einen pH-Änderung von pH 8,5 auf pH 5,0. Die Strep-Tactin-Säule (CV = 5 ml) wurde zunächst mit 15 ml Puffer A (67 mM NaK-Phosphatpuffer pH 8,5 mit 150 mM NaCl) äquilibriert. Im Anschluss wurden 5 - 10 ml Probe aufgetragen und die Säule nachfolgend mit 50 ml Puffer A gewaschen, um unspezifische Proteine abzutrennen. Die Elution erfolgte mit 20 ml Puffer B (67 mM NaK-Phosphatpuffer pH 5,0 mit 150 mM NaCl). Vor einem erneuten Probeauftrag wurde die Säule mit 15 ml Puffer A gewaschen. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt, durch Ultrazentrifugation (Vivaspin 50 Zentrifugationseinheiten, Vivascience, Hannover) ankonzentriert und der pH-Wert durch Zugabe von 1 M K_2HPO_4 auf 7,5 eingestellt. Nach der Zugabe von PMSF (1 mM Endkonzentration) wurde die Probe anaerobisiert.

Reinigung der Deletionsmutanten

Obwohl alle Methyltransferasen I, an deren N-Terminus Deletionen vorgenommen wurden, über ein C-terminales Strep-tag verfügten, konnten sie nicht über Affinitätschromatographie an Strep-Tactin gereinigt werden. Aus diesem Grund wurde eine andere Reinigungsstrategie basierend auf einer zweistufigen Größenausschlusschromatographie etabliert. Die Reinigung erfolgte unter anaeroben Bedingungen mittels einer Äkta-FPLC-Anlage (s. 2.6.1.). Als Laufpuffer wurde bei beiden Gelfiltrationssäulen 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 0,5 mM DTT verwendet. Auf eine Superdex 75-Säule (16/60, Säulenvolumen = 120 ml, Flussrate 1 ml/min) wurde 500 μl Rohextrakt der jeweiligen Deletionsmutante aufgetragen. Die Methyltransferasen eluierten nach ca. 90 - 95 ml. Die MT I-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrazentrifugation auf

ein Volumen von ca. 500 µl konzentriert. Diese Probe wurde anschließend auf eine zweite Gelfiltrationssäule, eine Superdex-200 Säule (16/60, Säulenvolumen = 120 ml, Flussrate 1 ml/min) aufgetragen. Die bei ca. 90 ml eluierte gereinigte Methyltransferase I wurde durch Ultrazentrifugation ankonzentriert, mit PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt und anaerobisiert.

2.7. Aktivitätsmessung

Die Enzymmessung erfolgte in anaeroben Quarzküvetten, die mit N₂ durchgast wurden. Das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Als Puffer wurde 50 mM Tris-HCl pH 7,5 verwendet.

2.7.1. MT I-Aktivität

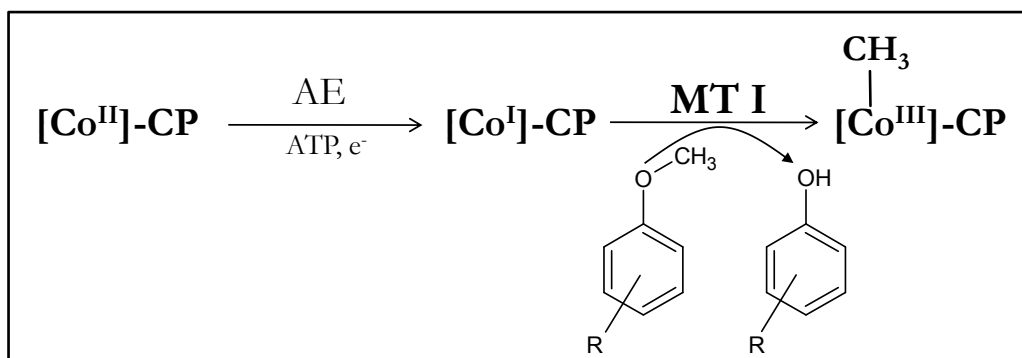


Abb. 2-1: Reaktionsschema der Aktivitätsmessung zur Bestimmung der Methyltransferase I-Aktivität. CP: Corrinoidprotein; AE: Aktivierendes Enzym; MT I: Methyltransferase I.

Die von der Methyltransferase I katalysierte Übertragung der Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoidprotein wurde photometrisch durch die Bildung von Methylcobalamin bestimmt. Anhand der Absorptionsänderung bei 528 nm ($\epsilon_{528} = 7,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Friedrich 1975) wurde die Aktivität berechnet. Als Substrat diente Vanillat für die Mutanten der MT I_{van} und Veratrol für die MT I_{ver}-Mutanten. Der Testansatz enthielt 2 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 5 mM Vanillat bzw. Veratrol, 50 mM DTT, 0,5 mM Ti(III)citrat, 50 µM rekombinantes CP_{van} und 10 µg AE. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MT I gestartet. Das Aktivierende Enzym wurde dem Enzymtest als Rohextrakt zugegeben (*E. coli* BL21 (DE3) pAE_{van}11b). Die Konzentration des Aktivierenden Enzyms wurde nach der Auftrennung des Rohextraktes über eine SDS-PAGE abgeschätzt. Das Aktivierende Enzym wurde im Überschuss zugesetzt, so dass eine Limitierung der Reaktion durch die Cobalaminreduktion ausgeschlossen wurde.

2.7.2. Bestimmung des Substratspektrums der Methyltransferasen I

Die Bestimmung des Substratspektrums wurde mit Hilfe des unter 2.7.1. beschriebenen Messansatzes durchgeführt. Für die Charakterisierung der Punktmutanten wurden Vanillat, Isovanillat, Syringat, Guajakol, Veratrol, 3-Hydroxyanisol, 2-Chloranisol, 3,4,5-Trimethoxybenzoat, Methylchlorid, Methanol und Methylamin eingesetzt. Für die Bestimmung des Substratspektrums der Deletionsmutanten wurde die Enzymaktivität zusätzlich mit Methionin, 2-Methoxybenzoat, Tetrahydrofuran, Methyl-*tert*-Butylether, Diethylether und Dichlormethan als Substrat bestimmt. Die Konzentration der Substrate im Testansatz betrug jeweils 5 mM, bei Methanol und Diethylether 5%. Für die Messung mit Methylchlorid als Substrat wurde die Küvette 5 min mit Methylchlorid durchgast.

2.7.3. Einfluss von zweiwertigen Metallionen und Metallchelatoren auf die MT I-Aktivität

Der Einfluss verschiedener Metallverbindungen wurde mit dem unter 2.7.1. beschriebenen Enzymtest untersucht. Es wurden ZnCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , CuSO_4 und FeSO_4 mit einer Endkonzentration von 10 bzw. 100 μM dem Testansatz zugesetzt. Die Messung erfolgte sowohl für die nativen Methyltransferasen I als auch für die rekombinanten Enzyme. Als Substrat wurden 5 mM Vanillat bzw. Veratrol zugegeben. Die Messung wurde durch die Zugabe der MT I gestartet. Für die Untersuchung des Einflusses von Metallchelatoren wurde dem Testansatz unmittelbar vor der Messung EDTA beziehungsweise Citrat zugesetzt und die Reaktion durch die Zugabe der Methyltransferase I gestartet. Eine mögliche reaktivierende Wirkung von Zink auf die mit EDTA und Citrat inkubierte Methyltransferase I wurde bei einer EDTA-Konzentration von 1 mM beziehungsweise mit 100 mM Citrat untersucht. Sowohl EDTA und Citrat als auch ZnCl_2 wurden dem Reaktionsansatz unmittelbar vor der Messung zugegeben und die Messung durch die Zugabe von MT I gestartet. Die Messungen wurden mit der nativen und der rekombinanten MT I_{ver} durchgeführt.

2.7.4. Enzymkinetische Charakterisierung der Methyltransferasen I

Die rekombinanten Methyltransferasen MT I_{van} und MT I_{ver} sowie die Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 wurden hinsichtlich der K_m - und V_{\max} -Werte enzymkinetisch charakterisiert. Die apparenten K_m -Werte wurden mit Hilfe des unter 2.7.1. beschriebenen Testansatzes bestimmt.

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter für das methylierte Substrat erfolgte bei einer Corrinoidprotein-Konzentration von 50 μM . Als Substrate wurden Vanillat (MT I_{van} und MT I_{van} 1d87), 3-Hydroxyanisol (MT I_{ver} und MT I_{van} 1d87) sowie Syringat (MT I_{van}, MT I_{ver} und MT I_{van} 1d87) eingesetzt. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der MT I-

Reaktion von der Konzentration des Corrinoidproteins erfolgte bei einer Konzentration von 5 mM des methoxylierten Substrates. Als Substrate dienten Vanillat (MT I_{van} und MT I_{van} 1d87) beziehungsweise 3-Hydroxyanisol (MT I_{ver}).

2.8. Analytische Methoden

2.8.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Als Nachweisreagenz diente Roti[®]-Nanoquant (Roth, Karlsruhe). Für die Messung wurden zu 50 µl Probe beziehungsweise Standard (0 – 100 µg/ml Rinderserumalbumin) 200 µl 1:5 mit bidestillierten Wasser verdünntes Nachweisreagenz gegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei 25°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.8.2. Zinkbestimmung

Die Bestimmung des Zinkgehaltes der Methyltransferasen I erfolgte nach der Methode von Zhou et al. (1999) unter Verwendung von PAR (4-(2-Pyridylazo)-Resorcinol). Um unspezifisch gebundenes Zink vor der Messung zu entfernen, wurde die Probe (Probenvolumen 500 µl) mit 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 und 10 mM EDTA versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um das zugesetzte EDTA wieder abzutrennen, wurde die Probe über eine Gelfiltration (Superdex 75 (16/60); Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; Flussrate 1 ml/min) gereinigt. Für die Messung wurden zu 180 µl Probe beziehungsweise Standard (0 - 20 µM Zinkchlorid) 25 µl 1 mM PAR gegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 500 nm gemessen.

2.9. Proteinbiochemische Methoden

2.9.1. Denaturierende PAGE (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese der Proteinproben wurde mit dem vertikalen System „Minigel-Twin“ von Biometra (Göttingen) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dabei anhand ihrer Größe und unabhängig von der Ladung. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels ist in Tabelle 2-12 aufgeführt. Als Laufpuffer wurde das von Laemmli (1970) etablierte Tris-Glycin-System (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 1% SDS) verwendet.

Die Proben wurden mit einem Volumen Probenpuffer (125 mM Tris HCl pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 10% (v/v) Mercaptoethanol; 0,01% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 13 mA im Sammelgel und 22 mA im Trenngel (pro Gel).

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der SDS-Gele.

	Trenngel (13,5%)	Sammelgel (6%)
Puffer ^a	2,05 ml	215 µl
AA/BIS ^b	3,35 ml	350 µl
H ₂ O _{ad}	2,00 ml	1,275 ml
APS (10% (w/v))	75 µl	19 µl
TEMED	3 µl	1,8 µl

^a Puffer: Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl pH 8,8 mit 0,4% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl pH 6,8 mit 0,4% (w/v) SDS

^b AA/BIS : gebrauchsfertige Lösung (Rotiphorese Gel 30; 37,5:1; Roth, Karlsruhe)

2.9.2. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden nach der Elektrophorese 15 min in Fixierlösung (25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) inkubiert und anschließend 30 min mittels Färbelösung (0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% (v/v) Essigsäure) gefärbt. Abschließend wurden die SDS-Gele mit 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.9.3. Silberfärbung

Bei der Auftrennung von Proben mit geringen Proteinkonzentrationen wurden die Gele nach der Elektrophorese mit Silber gefärbt, da diese Methode im Vergleich zur Coomassie-Färbung sensitiver ist. Zunächst wurden die Gele 30 min in der Fixierlösung (100 ml Ethanol, 25 ml Essigsäure, ad 250 ml A. bidest.) und nachfolgend 30 min in der Sensitivierungslösung (1,25 ml 25% Glutardialdehyd; 0,5 g Natriumthiosulfat; 17 g Natriumacetat; 75 ml Ethanol; ad 250 ml A. bidest.) inkubiert. Anschließend wurden die Gele gewaschen (A. bidest., 3 x 5 min), bevor sie 20 min in der Färbelösung (0,25% (w/v) Silbernitrat, 100 µl 37% Formaldehyd, ad 250 ml A. bidest.) inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschschrift (2 x 1 min mit A. bidest.) wurde Entwicklerlösung (6,25 g Natriumcarbonat, 50 µl 37% Formaldehyd, ad 250 ml A. bidest.) zugegeben und die Reaktion nach 2-15 min abgestoppt, indem die Gele 10 min in Stopplösung (3,65 g Natrium-EDTA, ad 250 ml A. bidest.) inkubiert wurden.

2.9.4. Western-Blot

Für den Nachweis mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, Freiburg) geblottet. Der Blot wurde nach einer 10-minütigen Äquilibration der Membran und des Geles in Blotpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) unter Verwendung der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad (München) durchgeführt (1 h bei 15 V). Nach dem Blot wurde die Marker-Spur abgeschnitten, getrennt für 5 min gefärbt (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) und anschließend in Entfärbelösung (90% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Die restliche Membran wurde für eine Stunde in Blocking Solution (Blocking Reagent, Roche, Mannheim) inkubiert und nachfolgend mit PBST-Puffer (140 mM NaCl; 10 mM KCl; 6,4 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,05% (v/v) Tween 20) gewaschen (3 x 10 min). Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 18°C mit dem proteinspezifischen primären Antikörper (Anti-MT I_{ver} 1:50.000; Anti-MT I_{van} 1:50.000 jeweils in PBST Puffer verdünnt) inkubiert. Die Produktion der proteinspezifischen polyklonalen Antikörper erfolgte in Kaninchen und wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBST-Puffer (3 x 10 min) erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur (anti-rabbit 1:20.000 in PBST-Puffer verdünnt, Goat Anti-Rabbit IgG-AP Conjugate, Bio-Rad, München). Nach einem erneuten Waschschriff mit PBST (3 x 10 min) wurde die Membran 2 min mit Entwicklerpuffer (100 mM Tris HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) äquilibriert. Im Anschluss wurde der Blot durch Übersichten mit Entwicklerlösung (45 µl NBT (75 mg/ml in 70% (v/v) DMF) und 35 µl x-Phosphat (50 mg/ml in 100% DMF) in 10 ml Entwicklerpuffer) entwickelt und die Reaktion abschließend durch eine 15-minütige Inkubation in Stopp-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,4; 1 mM EDTA) gestoppt.

2.10. Sonstige Methoden

2.10.1. Herstellung von Titan(III)-citrat

Das für die Aktivitätsmessungen verwendete Titan(III)-citrat wurde unter anoxischen Bedingungen (95% N₂, 5% H₂) in einer Anaerobierkammer (COY Laboratory, Grass Lake, Michigan, USA) hergestellt. Für die Herstellung von 20 ml Titan(III)citrat-Lösung wurde zu 10 ml 0,4 M Natriumcitrat pH 7,0 unter Rühren 4 ml Titan(III)chloridlösung (15%ig, Honeywell Riedel-de Haën, Seelze) gegeben. Im Anschluss wurde der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von 2 M Natriumcarbonat auf einen Wert von 7,0 – 7,5 eingestellt. Abschließend wurde die Lösung mit A. bidest auf das Endvolumen von 20 ml aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

2.10.2. Konzentrationsbestimmung des Corrinoidproteins

Das für die Enzymmessung der MT I-Aktivität benötigte Corrinoidprotein wurde, wie unter 2.6.2. beschrieben, gereinigt und rekonstituiert. Der Cofaktor des Protein-gebundenen Cobalamin liegt bei der Elution von der Mono-Q-Säule in der inaktiven Oxidationsstufe II vor. Für die Konzentrationsbestimmung wurde er mit Hilfe des Aktivierenden Enzyms in die $[\text{Co}^{\text{I}}]$ -Form überführt. Die Messung erfolgte in mit N_2 durchgasten Quarzküvetten. Der Testansatz enthielt 2 mM ATP; 10 mM MgCl_2 ; 0,5 mM Ti(III)citrat und ca. 10 μg AE (Rohextrakt *E. coli* BL21 (DE3) *pA_{Evan}11b*). Es wurden jeweils 50 μl der rot-braun gefärbten MonoQ-Fractionen eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Aktivierendem Enzym gestartet. Cob(I)alamin (386 nm, $\Delta\epsilon_{386\text{ nm}} = 21\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Siebert et al. 2005) und Cob(II)alamin (475 nm, $\epsilon_{475\text{ nm}} = 9,2\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, Friedrich 1975) zeichnen sich durch unterschiedliche Absorptionsmaxima aus. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde anhand der Absorptionsänderungen die Konzentration des B_{12} -Cofaktors bestimmt.

3. Ergebnisse

Acetobacterium dehalogenans gehört zu den methylotrophen acetogenen Bakterien und kann Methylgruppen von verschiedenen Substraten über den reduktiven Acetyl-CoA-Weg als Energiesubstrat verwerten. Der Organismus kann dabei auch die Methylgruppen von Phenylmethylethern als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Schlüsselenzym des methylotrophen Stoffwechsels ist der O-Demethylase-Komplex, welcher, bestehend aus zwei Methyltransferasen, einem Corrinoidprotein und dem Aktivierenden Enzym, die Etherspaltung und die Übertragung der Methylgruppe vom Substrat auf Tetrahydrofolat katalysiert. *A. dehalogenans* verfügt über mindestens zwei verschiedene O-Demethylase-Systeme (Kaufmann et al. 1997, Kaufmann et al. 1998, Engelmann et al. 2001), die substratspezifisch induziert werden. Die Methyltransferase I bestimmt dabei die Substratspezifität des gesamten Komplexes, da sie die Übertragung der Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoidprotein katalysiert. Die Gensequenz beider Methyltransferasen I ist bekannt und beide Proteine wurden bereits in *Escherichia coli* heterolog exprimiert (Schilhabel, Studenik et al. 2009). Alkyltransferasen, zu denen auch die Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* zählen, sind zinkhaltige Enzyme (Hagemeyer et al. 2006), wobei Zink direkt an der katalytischen Aktivität beteiligt ist. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand daher die Charakterisierung der nativen und rekombinanten Methyltransferasen I, wobei der Schwerpunkt auf der Identifizierung des Bindemotivs des Zinks sowie in der Untersuchung der Substratspezifität lag.

3.1. Charakterisierung der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase

Für die Charakterisierung der nativen Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase (MT I_{van}) wurde das Enzym aus mit Syringat kultivierten *A. dehalogenans* Zellen isoliert. Die native Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase (MT I_{ver}) wurde aus *A. dehalogenans* Zellen, welche mit 3 Hydroxyanisol kultiviert wurden, gereinigt. Die rekombinanten Enzyme MT I_{van} und MT I_{ver} wurden in *E. coli* BL21 (DE 3) beziehungsweise *E. coli* BL21 pRII exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Enzymaktivitäten und Substratspektren der nativen und rekombinanten Methyltransferasen I wurden photometrisch bestimmt. Da eine Vielzahl von Enzymen über Metall-Kofaktoren verfügt, wurde der Einfluss verschiedener Metallionen auf die Aktivität der nativen und rekombinanten Enzyme untersucht. Von beiden Methyltransferasen ist zum jetzigen Zeitpunkt keine Kristallstruktur verfügbar, so dass für beide Proteine *in silico*-

Analysen der MT I-Gene und Strukturvergleiche mit bekannten Kristallstrukturen von Enzymen ähnlicher Funktion durchgeführt wurden.

3.1.1. Substratspektrum der nativen und rekombinanten MT I_{van} und MT I_{ver}

Die Enzymaktivität der Methyltransferasen I wurde spektrophotometrisch durch die Bildung von Methylcobalamin bestimmt. Das rekonstituierte rekombinante Corrinoideprotein, dessen Cobalamin-Kofaktor sich nach der Reinigung in der inaktiven Oxidationsstufe II befand, wurde im Testansatz zunächst durch die Aktivität des Aktivierenden Enzyms in die superreduzierte [Co^I]-CP-Form überführt. In dieser Oxidationsstufe dient das Corrinoideprotein als Methylgruppenakzeptor. Durch die MT I-Aktivität wird die Methylgruppe des Substrates unter Bildung von Methylcobalamin auf das superreduzierte [Co^I]-CP übertragen. Das durch die MT I-Aktivität gebildete Methylcobalamin ist photometrisch durch seine Absorption bei 528 nm nachweisbar. Der zeitliche Verlauf der Methylierung des Corrinoideproteins ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

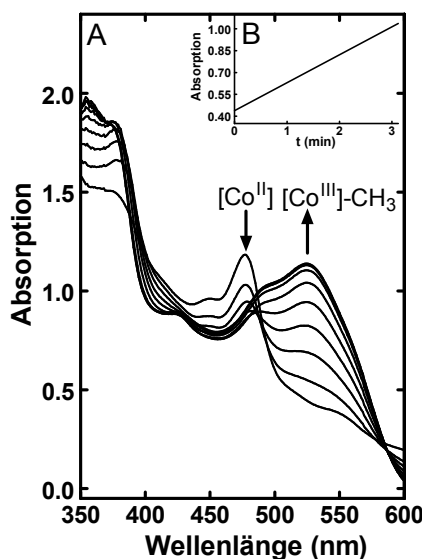


Abb. 3-1: Kinetik der Methylierung von CP_{van}. Die Enzymaktivität wurde über die Änderung des Absorptionsspektrums bei 528 nm gemessen. A: Methylierung von CP durch die MT I_{van}-Aktivität. B: zeitlicher Verlauf der Bildung von Methylcobalamin. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Vanillat; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{van}.

Die Übereinstimmung der im photometrischen Test ermittelten Enzymaktivitäten mit dem durch HPLC-Messungen bestimmten Substratverbrauch konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden (Studenik 2008). Unter Verwendung des photometrischen Tests konnte für die gereinigte native MT I_{van} eine spezifische Aktivität von 7,14 nkat/mg mit Vanillat als Substrat bestimmt werden (Tab. 3-1). Die gereinigte rekombinante MT I_{van} wies eine spezifische Aktivität von 2,43

nkat/mg auf. Beide Enzyme zeigten das gleiche Substratspektrum (Tab. 3-1). Sie konnten von den getesteten Substraten nur Vanillat, Isovanillat, Syringat und Guajakol demethylieren. Die native Methyltransferase I wies im Vergleich zum rekombinanten Enzym bei allen Substraten eine 2-3-fach höhere spezifische Aktivität auf.

Tab. 3-1: Bestimmung des Substratspektrums der nativen und rekombinanten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase. Die Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität $\leq 0,01$ nkat/mg.

Substrate	Spezifische Aktivitäten (nkat/mg)			
	MT I _{van} nativ	MT I _{van} rek.	MT I _{ver} nativ	MT I _{ver} rek.
Vanillat	7,14	2,43	0,22	0,32
Isovanillat	10,78	5,82	1,98	2,09
Syringat	5,99	2,43	1,98	1,05
Guajakol	3,23	1,26	1,43	1,52
Veratrol	0	0	2,53	3,29
3-Hydroxyanisol	0	0	2,75	3,93
2-Chloranisol	0	0	1,43	1,21
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0
Methylchlorid	0	0	1,92	0,44
Methanol	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat

Die spezifischen Aktivitäten der gereinigten nativen und rekombinanten Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase betrugen mit Veratrol als Substrat 2,53 bzw. 3,29 nkat/mg (Tab. 3-1). Beide Enzyme konnten, mit Ausnahme von 3,4,5-Trimethoxybenzoat, Methanol und Methylamin, alle getesteten Substrate verwerten. Die spezifischen Aktivitäten des nativen und rekombinanten Enzyms lagen, mit Ausnahme von Syringat (Aktivität der rekombinanten MT I_{ver} um den Faktor 2 geringer) und Methylchlorid (Aktivität der rekombinanten MT I_{ver} um den Faktor 4 geringer), in der gleichen Größenordnung (Tab. 3-1). Die MT I_{ver} wies ein breiteres Substratspektrum als die MT I_{van} auf (Tab. 3-1). Sie konnte neben den MT I_{van}-Substraten auch Veratrol, 3-Hydroxyanisol, 2-Chloranisol und Methylchlorid umsetzen. Die höchste spezifische Enzymaktivität konnte für MT I_{van} mit Isovanillat und für MT I_{ver} mit 3-Hydroxyanisol als Substrat bestimmt werden.

Für die Messung der MT I-Aktivität wurde DTT zugesetzt, um optimale Reaktionsbedingungen zu ermöglichen. Bei einer Konzentration von 50 mM DTT konnte die höchste spezifische Aktivität bestimmt werden (gezeigt für die native MT I_{ver} in Abb. 3-2). Diese Konzentration wurde für alle Enzymmessungen eingesetzt. DTT-Konzentrationen größer als 100 mM führten zu einer Inaktivierung des Aktivierenden Enzyms, so dass kein superreduziertes Corrinoidprotein im Messansatz gebildet werden konnte. Dies wiederum führte dazu, dass für die Methyltransferasen I keine Enzymaktivität mehr gemessen wurde (Abb. 3-2).

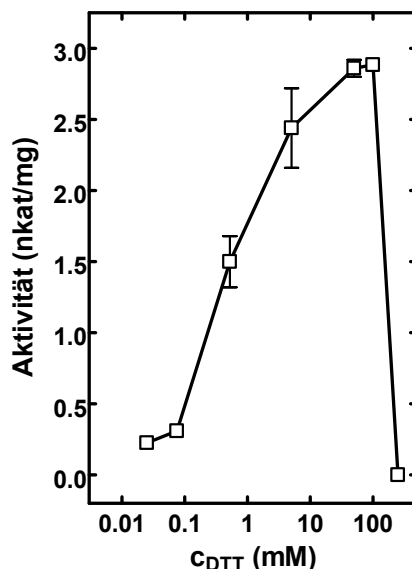


Abb. 3-2: Einfluss von DTT auf die spezifische Aktivität der nativen MT I_{ver}. Die Enzymaktivität wurde mit Veratrol als Substrat bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Veratrol; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{ver}.

3.1.2. Metall-Kofaktoren der Methyltransferase I

Da viele Enzyme Metall-Kofaktoren aufweisen, die für die katalytische Funktion von Proteinen essentiell sind (Karlin 1993), wurde der Einfluss verschiedener Metall-Kationen auf die MT I-Aktivität untersucht. Dem Testansatz der Aktivitätsmessung (siehe Material und Methoden 2.7.3.) wurden verschiedene Metallionen direkt zugesetzt und die Messung sofort durch Zugabe von MT I gestartet. Bei den nativen und rekombinanten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase konnte eine Verdopplung beziehungsweise eine Verdreifachung der Aktivität durch die Zugabe von Zink (100 µM) erreicht werden (Abb. 3-3 und 3-4). Bei allen vier Enzymen konnte auch für 100 µM Mg²⁺ ein aktivitätssteigernder Effekt nachgewiesen werden, dieser war jedoch nicht so ausgeprägt wie die durch die Zugabe von Zink erzielte Wirkung (Abb. 3-3 und 3-4). Durch die Zugabe von Cu²⁺ sanken die Aktivitäten der nativen sowie der

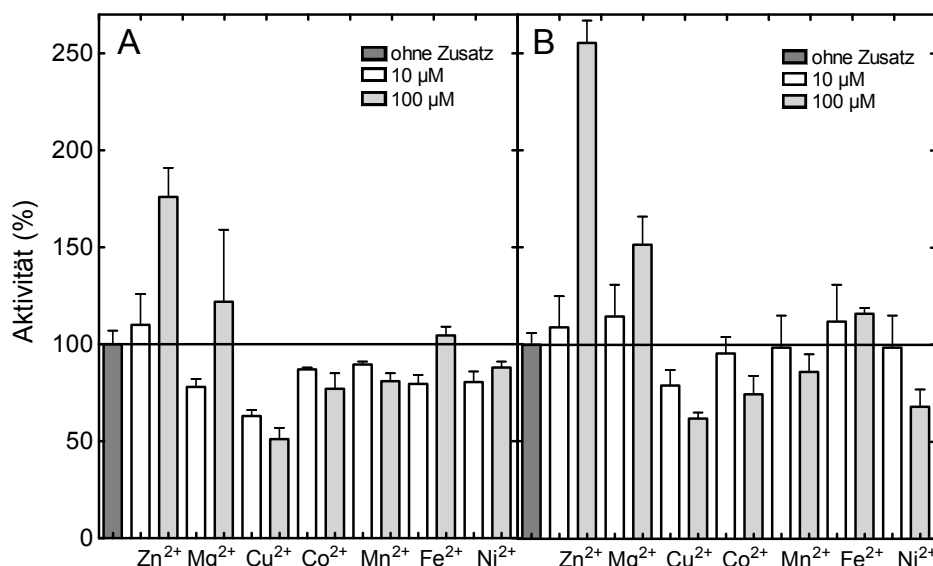


Abb. 3-3: Einfluss von zweiwertigen Metallionen auf die MT I_{van}-Aktivität. A: MT I_{van} nativ. B: MT I_{van} rekombinant. 100% Aktivität wurde mit der Aktivität der MT I ohne Zusatz von Metallionen gleichgesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Vanillat; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{van}.

rekombinanten MT I_{van} um 50% (Abb. 3-3). Auch die Inkubation mit Cobalt, Mangan und Nickel resultierte in einer etwas geringeren Aktivität der beiden Enzyme. Jedoch war dieser Effekt deutlich schwächer als bei der Inkubation mit Kupfer. Die Anwesenheit von Eisen hat sowohl bei der nativen als auch bei der rekombinanten MT I_{van} keinen Einfluss auf die Aktivität.

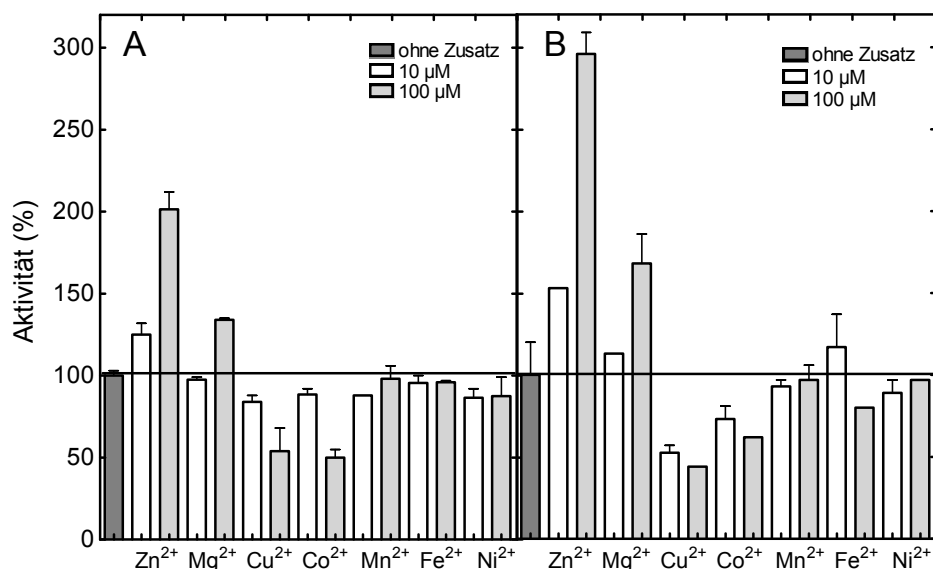


Abb. 3-4: Einfluss zweiwertiger Metallionen auf MT I_{ver}-Aktivität. A: MT I_{ver} nativ. B: MT I_{ver} rekombinant. 100% Aktivität wurde mit der Aktivität der MT I ohne Zusatz von Metallionen gleichgesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Veratrol; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{ver}.

Die Enzymaktivitäten der nativen und rekombinanten MT I_{ver} wurden durch den Zusatz von Kupfer beziehungsweise Cobalt deutlich reduziert. Bei der Zugabe von 100 µM der beiden Metallionen betrug die Aktivität nur noch 50% der Ausgangsaktivität (Abb. 3-4). Der Zusatz von Mangan, Eisen und Nickel hat keinen Einfluss auf die Aktivität der beiden MT I_{ver}-Enzyme.

Für die nativen und rekombinanten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase konnte eine Aktivitätssteigerung durch die Zugabe von 100 µM Zink nachgewiesen werden. Da Zink als einziges Metall einen deutlich aktivitätssteigernden Effekt auf die MT I zeigte, wurde der Einfluss dieses Metallions genauer untersucht (Abb. 3-5). Zunächst wurde der Zinkgehalt des Messansatzes ohne zugesetztes Zink mittels des photometrischen Tests (siehe Material und Methoden 2.8.2.) bestimmt. Ohne Zusatz von MT I oder zusätzlichem Zink betrug die Zinkkonzentration des Messansatzes zur photometrischen Bestimmung der MT I-Aktivität 5 µM. Dieser Wert wurde daher als Ausgangskonzentration des Zinks im Enzymtest angenommen. Die stufenweise Zugabe von Zink zeigte eine stetige Zunahme der MT I-Aktivität. Bei einer Zinkkonzentration von 100 µM war die Aktivität um den Faktor 2 gesteigert (Abb. 3-5). Höhere Konzentrationen von Zink bewirkten keine weitere Veränderung der Enzymaktivität. Zink-Konzentrationen über 1 mM führten zum Ausfall der MT I in der Küvette.

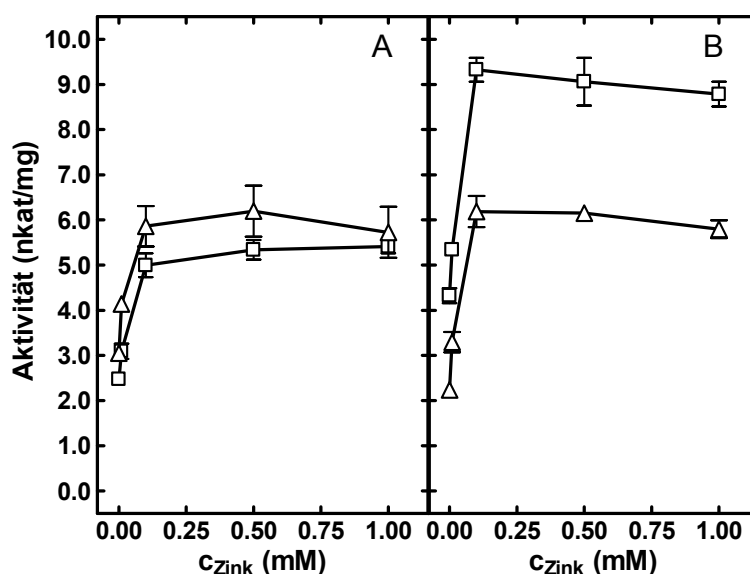


Abb. 3-5: Einfluss von Zink auf die MT I-Aktivität. A: MT I-Aktivität der nativen Enzyme in Abhängigkeit von Zink. B: Enzymaktivität der rekombinanten MT I in Abhängigkeit der Zinkkonzentration. Δ MT I_{van} □ MT I_{ver}. Zink wurde als ZnCl₂ unmittelbar vor der Messung dem Reaktionsansatz zugesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Vanillat beziehungsweise Veratrol; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{van} oder MT I_{ver}.

Der Einfluss von Zink wurde außerdem mit Guajakol als Substrat untersucht, da beide Methyltransferasen I in der Lage sind, Guajakol mit vergleichbaren spezifischen Aktivitäten zu

demethylieren (Tab. 3-1). Dem Reaktionsansatz wurde 0 und 500 μM Zink zugesetzt, bevor die Reaktion durch Zugabe von MT I gestartet wurde. Bei beiden Methyltransferasen (MT I_{van} und MT I_{ver}) konnte sowohl für das native als auch für das rekombinante Enzym eine Verdopplung der Aktivität durch die Zugabe von 500 μM Zink nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Methylchlorid, welches von beiden MT I_{ver}-Enzymen demethyliert werden konnte (Tab. 3-1), unterscheidet sich deutlich von den anderen getesteten Substraten, da es im Vergleich zu den komplexen Phenylmethylethern ein kleines Molekül ohne aromatische Strukturen ist. Aus diesem Grund wurde auch mit diesem Substrat der Einfluss von Zink untersucht. Als Enzym wurde die native MT I_{ver} eingesetzt. Die Zugabe von 100 μM Zn^{2+} führte auch mit diesem Substrat zu einer Verdopplung der Aktivität (von 1,19 nkat/mg auf 2,86 nkat/mg). Bei weiterer Erhöhung der Zinkkonzentration sank die spezifische Aktivität stärker als bei den anderen getesteten Substraten ab, bei der Inkubation mit 1 mM Zink betrug sie noch 2,23 nkat/mg. Eine weitere Erhöhung der Zinkkonzentration führte auch mit Methylchlorid als Substrat zu einer Präzipitation der Methyltransferase I, so dass keine weitere Messung möglich war.

EDTA ist in der Lage, Zink zu komplexieren und es somit der Reaktion zu entziehen (Carver et al. 1984). Zink, das im Protein gebunden ist, wird durch die Inkubation mit EDTA hingegen nicht gelöst (siehe auch LeClerc und Grahame 1996), da nach der Inkubation mit EDTA für die MT I ein Zinkgehalt von 1 mol Zink pro mol Enzym bestimmt werden konnte (Tab. 3-2). Der Zusatz von 1 mM EDTA zum Enzymtest führte sowohl bei der nativen als auch bei der

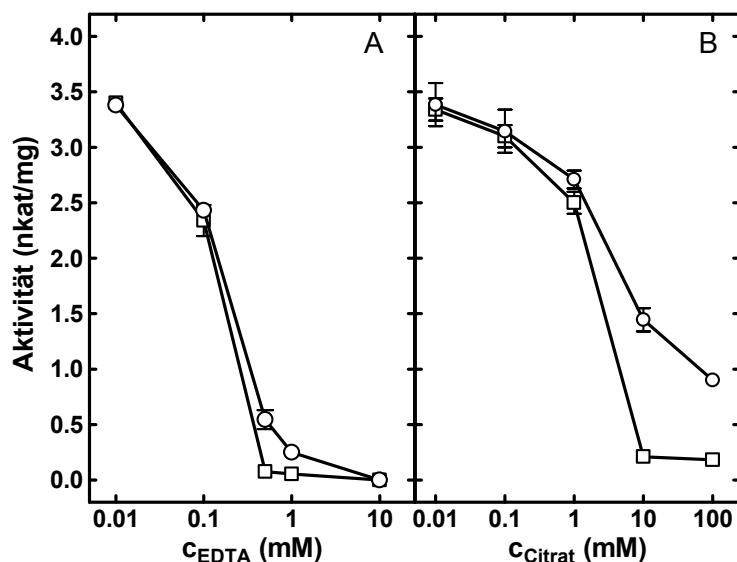


Abb. 3-6: Einfluss von komplexierenden Verbindungen auf die MT I_{ver}-Aktivität. A: Einfluss von EDTA auf die MT I_{ver}-Aktivität. B: MT I_{ver}-Aktivität in Abhängigkeit der Citratkonzentration. \square MT I_{ver} nativ; \circ MT I_{ver} rekombinant. EDTA und Citrat wurden dem Reaktionsansatz unmittelbar vor der Messung zugesetzt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 μM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl_2 ; 5 mM Veratrol; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 μg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 μM MT I_{ver}.

rekombinanten MT I_{ver} zu einer fast vollständigen Inaktivierung (Abb. 3-6 A). Bei einer EDTA-Konzentration von 10 mM wurde keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen. Zusätzlich zu EDTA wurde auch der Einfluss von Citrat untersucht, da für Tricarbonsäuren ebenfalls eine komplexierende Wirkung vermutet wurde. Citrat wurde dem Messansatz zugesetzt und die Aktivität direkt bestimmt. Auch diese Verbindung hatte eine inhibierende Wirkung auf die native und die rekombinante MT I_{ver}. Jedoch wurde selbst bei einer Konzentration von 100 mM Citrat keine vollständige Inaktivierung erreicht (Abb. 3-6 B). Für die native MT I_{ver} wurde eine Restaktivität von 10% bestimmt. Die rekombinante MT I_{ver} wies noch ca. 30% ihrer Ausgangsaktivität auf.

Da EDTA Zink komplexieren aber das Metall nicht aus dem Protein herauslösen kann, sollte die inaktivierende Wirkung dieser Verbindung durch Zugabe von Zink behebbar sein. Ähnliches wurde für Citrat vermutet. Durch den Zusatz von 1 mM Zink zum Messansatz, der ebenfalls 1 mM EDTA enthielt, konnte für das native und das rekombinante Enzym die normale Enzymaktivität, also die Aktivität ohne jeglichen Zusatz von Zink oder EDTA, erreicht werden (Abb. 3-7 A). Durch eine weitere Erhöhung der Zinkkonzentration (2 mM Endkonzentration) konnte die Aktivität um den Faktor zwei gesteigert werden (Abb. 3-7 A). Höhere

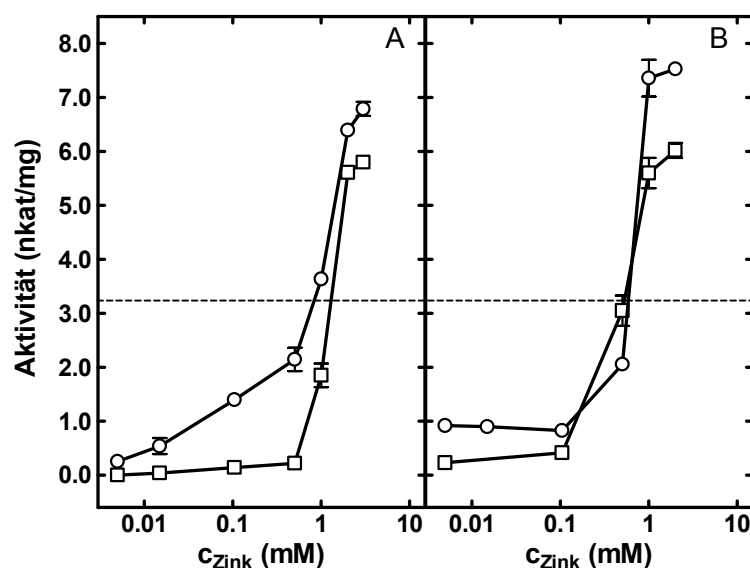


Abb. 3-7: Einfluss von Zink auf MT I_{ver}-Aktivität in Gegenwart von EDTA beziehungsweise Citrat. Das Zink wurde dem Reaktionsansatz in Form von ZnCl₂ unmittelbar vor der Messung zugesetzt. Die Enzymaktivität ohne Zusatz von Citrat, EDTA und Zink ist als gestrichelte Linie dargestellt. A: Einfluss von Zink und EDTA auf die MT I_{ver}-Aktivität. Der Messansatz enthielt 1 mM EDTA. B: Einfluss von Zink und Citrat auf die MT I_{ver}-Aktivität. Der Messansatz enthielt 100 mM Citrat. □ MT I_{ver} nativ; ○ MT I_{ver} rekombinant. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 5 mM Veratrol; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I_{ver}.

Zinkkonzentrationen führten wiederum zur Präzipitation der MT I. Für den Messansatz mit 100 mM Citrat konnte ein ähnlicher Effekt nachgewiesen werden (Abb. 3-7 B). Durch den Zusatz von 1 mM Zink wurde die ursprüngliche Aktivität, durch Zugabe von 2 mM Zink die doppelte Enzymaktivität erreicht (Abb. 3-7 B).

Die reversible Inhibierung der Methyltransferasen I durch den Metallchelator führte zu der Vermutung, dass ein für die Funktion essentielles Metall im Enzym gebunden ist. Aus diesem Grund wurde der Metallgehalt der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase untersucht. In einer früheren Arbeit (Engelmann 2002) wurde für die native MT I_{ver} durch ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) ein Zinkgehalt von 1 mol Zink pro mol Enzym nachgewiesen. Der Zinkgehalt der Methyltransferasen I wurde in der vorliegenden Arbeit mittels eines photometrischen Tests (siehe Material und Methoden Kapitel 2.8.2.) bestimmt. Da Zink unspezifisch an Proteinoberflächen binden kann, wurden die Enzymproben vor der Zinkbestimmung mit EDTA behandelt, um überschüssiges Zink abzutrennen. Für die Methyltransferasen MT I_{van} und MT I_{ver} konnte sowohl für das native als auch für das rekombinante Enzym ein Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein bestimmt werden (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Bestimmung des Zinkgehaltes der nativen und rekombinanten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase.

Methyltransferase	Zinkgehalt (mol Zink pro mol Protein)
MT I _{van} nativ	0,96 ± 0,03
MT I _{van} rekombinant	1,02 ± 0,01
MT I _{ver} nativ	0,95 ± 0,03
MT I _{ver} rekombinant	1,00 ± 0,04

3.1.3. *In silico*-Analysen der Methyltransferase I-Gene

Die Gene der beiden Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase wurden identifiziert und sind mit dem jeweiligen Corrinoidprotein (CP_{van} oder CP_{ver}) und der entsprechenden Methyltransferase II (MT II_{van} oder MT II_{ver}) auf einem gemeinsamen Operon organisiert (Abb. 1-4). Im Gegensatz zu den Corrinoidproteinen und den Methyltransferasen II, welche hohe Sequenzhomologien aufwiesen (75-80% identische Aminosäuren, Daten nicht gezeigt), unterschieden sich die beiden MT I-Enzyme hinsichtlich der Aminosäuresequenz deutlich. MT I_{van} und MT I_{ver} wiesen lediglich 22% identische Aminosäuren auf

(Abb. A-3, Anhang). Der Vergleich der beiden Aminosäuresequenzen zeigte zudem keine konservierten Bereiche mit hohen Homologien, welche Rückschlüsse auf die Lokalisation des Zinkbindemotives, des aktiven Zentrums oder der Bindestellen der Substrate (Corrinoidprotein und Phenylmethylether) zuließen. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Enzyme mit bekannten Motiven wie Bindemotiven von Eisen-Schwefel-Zentren oder anderer Metall-Kofaktoren mittels PROSITE (Hulo et al. 2008) zeigte keine signifikanten Übereinstimmungen (Daten nicht gezeigt).

Für beide Methyltransferasen I konnten bis heute keine Kristallstrukturen erzeugt und damit auch keine Röntgenstrukturanalysen durchgeführt werden. Es gelang die Erzeugung kleiner Kristalle von der rekombinanten MT I_{van} (S. Studenik, persönliche Mitteilung). Jedoch konnte bei der Messung mit dem Synchrotron kein Brechungsmuster erzeugt werden, da die Kristalle wahrscheinlich nicht ausreichend groß waren. Für die anschließende Untersuchung der Zinkbindemotive und des aktiven Zentrums des Enzyms erfolgten daher zunächst computerbasierende Analysen der Sekundärstrukturen im Vergleich zu bereits bekannten Kristallstrukturen (Abb. 3-9).

Sowohl für MT I_{van} als auch für MT I_{ver} wurde durch die Strukturvorhersage (Quickphyre-Programm; Bennett-Lovsey et al. 2008) eine TIM-Barrel-Struktur prognostiziert, also eine Abfolge von α -Helices und β -Faltblättern, die eine fassähnliche Struktur bilden (Reardon und Farber 1994). Die mit Quickphyre (Bennett-Lovsey et al. 2008) durchgeführte Strukturvorhersage zeigte eine hohe Übereinstimmung der Strukturen von MT I_{van} und MT I_{ver} mit der Kristallstruktur der Uroporphyrinogen-Decarboxylase von *Bacillus subtilis* (Fan et al. 2007). Die ersten 353 der insgesamt 1227 Aminosäuren der Cobalamin-abhängigen Methioninsynthase von *E. coli* katalysieren die Übertragung der Methylgruppe von Methylcobalamin auf Homocystein (Goulding und Matthews 1997). Die Strukturvorhersagen für diese beiden Enzyme zeigten ebenfalls eine TIM-Barrel Struktur der Enzyme. Der C-Terminus der vorhergesagten Sekundärstrukturen für die beiden Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* ähnelt deutlich der strukturellen Organisation des C-Terminus der Uroporphyrinogen-Decarboxylase und der Cobalamin-abhängigen Methioninsynthase (Abb. 3-8). Der N-Terminus (Aminosäuren 1-120) hingegen unterscheidet sich bei den beiden Methyltransferasen I deutlich voneinander (Abb. 3-8). Zudem bestehen auch keine Homologien zu den Strukturen der anderen beiden Enzyme.

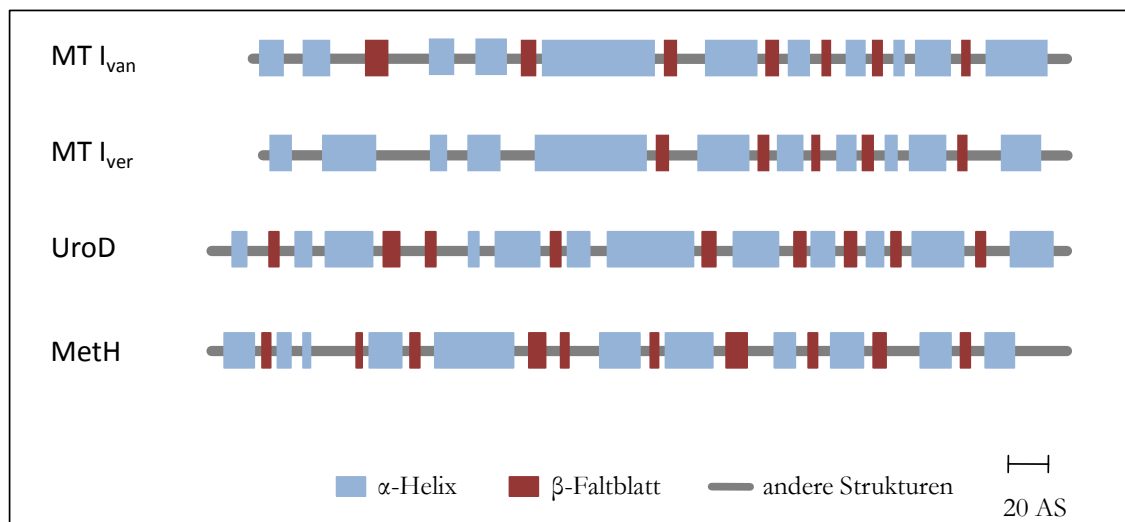


Abb. 3-8: Strukturanalyse der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase. Sekundärstrukturvorhersagen für die MT I der Vanillat-O-Demethylase (MT I_{van}), die MT I der Veratrol-O-Demethylase (MT I_{ver}), die Urophyrinogen-Decarboxylase von *Bacillus subtilis* (UroD, Hansson und Hederstedt 1992) und die Cobalamin-abhängige Methioninsynthase von *Escherichia coli* (MetH, Aminosäuren 1-353, Johnson et al. 2007). Die Strukturvorhersagen erfolgten unter Nutzung des Quickphyre-Programms (Bennett-Lovsey et al. 2008).

3.2. Identifizierung der Zinkbindemotive von MT I_{ver} und MT I_{van}

Für die nativen und die rekombinanten Methyltransferasen I konnte ein Zinkgehalt von etwa 1 mol Zink pro mol Protein nachgewiesen werden. Sowohl die Methyltransferase I der Vanillat- als auch die Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase zeigten keine Übereinstimmungen mit den Bindemotiven, die für zinkhaltige Enzyme ähnlicher Funktion beschrieben wurden (siehe Einleitung Tab.1-1). Obwohl das Zinkbindemotiv der Methanol-Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* (Hagemeier et al. 2006) keine Übereinstimmung mit MT I_{ver} zeigte, konnten in der Sequenz der MT I_{ver} Aminosäuren lokalisiert werden die durch ähnliche Abstände voneinander getrennt waren wie die zinkbindenden Aminosäuren des MtaB-Zinkbindemotives und potenziell Zink binden könnten. Diese sollten daher mittels Punktmutation ausgetauscht werden, um ihre mögliche Funktion als Zinkbindepertner zu untersuchen.

3.2.1. PCR-Strategie zur Erzeugung von Punktmutanten

Um die mögliche Beteiligung einzelner Aminosäuren am Zinkbindemotiv zu untersuchen, wurden diese durch Alanin ersetzt. Der Austausch der Aminosäuren erfolgte durch eine gerichtete Mutagenese unter Verwendung zweier verschiedener PCR-Methoden. Zunächst

wurden die Punktmutanten mittels der Megaprimer-PCR erzeugt (Sarkar und Sommers 1990), bei der in zwei PCR-Schritten das mutierte Gen amplifiziert wurde (Abb. 3-9). In der ersten PCR wurde durch die Kombination eines mutierten Forward-Primers und eines am 3'-Ende des Gens ansetzenden Reverse-Primers (Abb. 3-9, 1. PCR) ein großes Genfragment erzeugt. Der im ersten PCR-Schritt eingesetzte mutierte Forward-Primer, in dessen Sequenz das zu mutierende Codon gegen ein Codon für Alanin ausgetauscht wurde, setzte dabei an der Stelle im Gen an, wo der Austausch der Nukleotide für die Punktmutation erfolgen sollte. Das im ersten PCR-Schritt erzeugte Genfragment fungierte in der 2. PCR als Reverseprimer für die Erzeugung des kompletten Gens (Abb. 3-9, 2. PCR), welches nun die gewünschte Punktmutation trug.

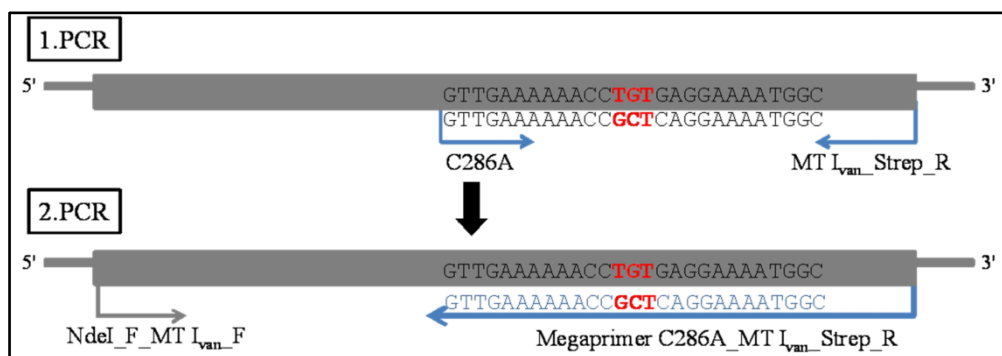


Abb. 3-9: Erzeugung von Punktmutanten mittels Megaprimer-PCR am Beispiel von MT I_{van} C286A. In beiden PCR-Schritten diente genomische DNA als Template. Der im ersten PCR-Schritt erzeugte mutierte Megaprimer diente als Reverse-Primer im zweiten PCR-Schritt.

Die Aminosäuresequenz von MT I_{van} enthält nur ein Cystein, welches sich am C-terminalen Ende der Sequenz an Position 286 befindet. Das Codon für dieses Cystein wurde mittels der oben beschriebenen Megaprimer-PCR gegen ein Codon für Alanin ausgetauscht. Das im ersten PCR-Schritt erzeugte Fragment mit 178 bp (Abb. 3-10 A) wurde gereinigt und, nach 20-minütiger Inkubation bei 65°C zur Herstellung von Einzelsträngen des Primers, als Reverse-Primer in der zweiten PCR eingesetzt. In diesem PCR-Schritt wurde, neben dem erwarteten DNA-Fragment von etwa 1000 bp, eine Reihe von PCR-Nebenprodukten amplifiziert (Abb. 3-10 B). Auch höhere Annealing-Temperaturen führten zu keiner spezifischeren Amplifikation. Das Amplifikat mit einer Größe von 1000 bp wurde gereinigt und für die weiteren Klonierungsschritte verwendet, wobei die Konzentration durch die niedrige Ausbeute jedoch gering war. Zudem zeigten einige Klone, die das Gen trugen, nicht die gewünschte Mutation, so dass eine andere Methode gewählt wurde: die Erzeugung von Punktmutanten mittels „overlap extension PCR“.

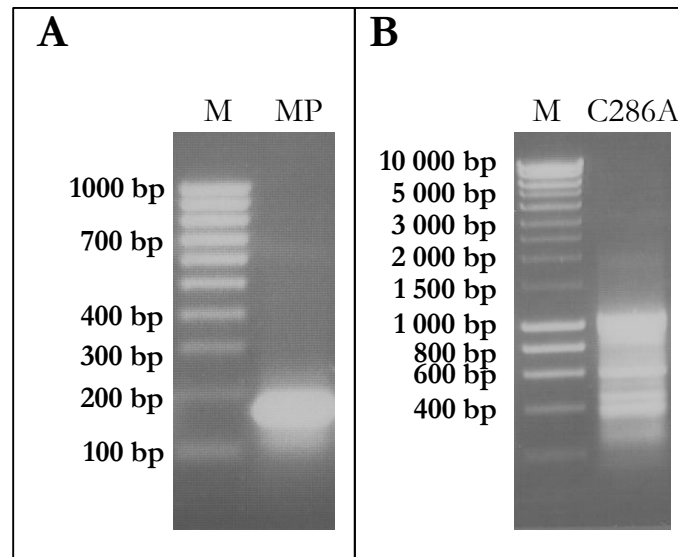


Abb. 3-10: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben für die Erzeugung der Punktmutante MT I_{van} C286A mittels Megaprimer-PCR. A: Erzeugung des mutierten Megaprimers. B: Amplifizierung des gesamten Gens unter Verwendung des Megaprimers als Reverseprimer. M: Marker; MP: Megaprimer *C286A-strep_BamHI*; C286A: *mtI_{van} C286A*.

Für die Erzeugung von Mutanten mittels „overlap extension PCR“ (An et al. 2005) wurde mit Hilfe von zwei das Gen flankierenden und zwei im Gen bindenden Primern in getrennten PCR-Reaktionen zwei Fragmente amplifiziert (Abb. 3-11, 1. PCR). Der Austausch der Nukleotide erfolgte dabei über die im Gen bindenden Primer, die beide die Mutation trugen. Diese beiden Primer, in ihrer Sequenz zueinander komplementär, fungierten als Forward- beziehungsweise Reverseprimer. Für die Amplifikation des ersten Genfragmentes wurde der mutierte Reverse-Primer in Kombination mit dem am 5'-Ende ansetzenden Forward-Primer verwendet. Die Synthese des zweiten Genfragmentes erfolgte durch die Verwendung des mutierten Forward-Primers und des am 3'-Ende lokalisierten Reverse-Primers (Abb. 3-11, 1. PCR). Die beiden so amplifizierten Genfragmente überlappten sich an ihrem 3'-(1. Genfragment) beziehungsweise an ihrem 5'-Ende (2. Genfragment), also in dem Genbereich, der durch die Punktmutation ausgetauscht wurde (Abb. 3-11, 2. PCR). Im zweiten PCR-Schritt wurde das MT I-Gen aus diesen beiden überlappenden Genfragmenten vollständig synthetisiert, wodurch durch die Überlappung des veränderten Bereichs der Erhalt der Mutation gewährleistet wurde. In einem dritten PCR-Schritt (Abb. 3-11, 3. PCR) erfolgte durch die Kombination der beiden flankierenden Primer die Amplifikation des mutierten Gens in hohen Ausbeuten.

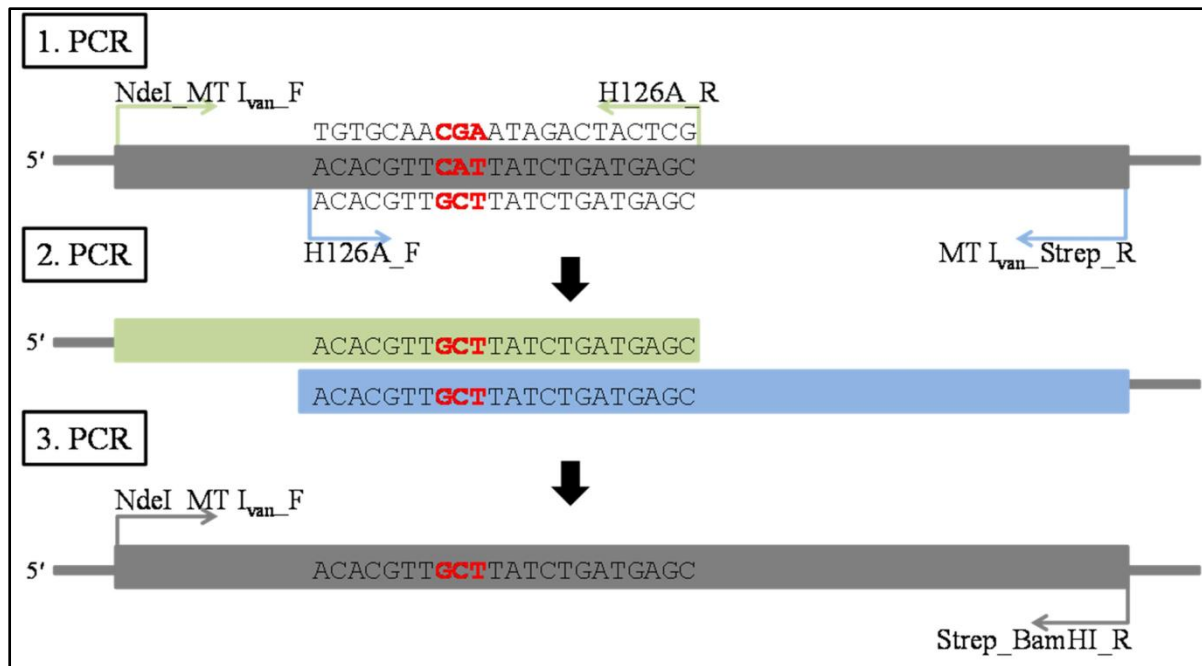


Abb. 3-11: Erzeugung von Punktmutationen mittels overlap-extension-PCR am Beispiel von MT I_{van} H126A. Die im ersten PCR-Schritt erzeugten Genfragmente, bei denen die Mutation eingefügt wurde, dienten als Template-DNA der zweiten PCR. Das im zweiten PCR Schritt komplettierte Gen wurde als Template-DNA in der dritten PCR eingesetzt. Das mutierte Codon wurde rot hervorgehoben.

Mit Ausnahme der mittels Megaprimer-PCR erzeugten Mutante MT I_{van} C286A wurden alle anderen Punktmutanten mittels der oben beschriebenen „overlap-extension-PCR“ hergestellt. In Abb. 3-12 wurden als Beispiel die PCR-Produkte der Amplifikation von MT I_{van} H126A dargestellt. Die im ersten PCR-Schritt erzeugten Fragmente (Abb. 3-12 A) zeigten die richtige Größe von ca. 380 (Spur 1) beziehungsweise 630 bp (Spur 2). Die Fragmente wurden gereinigt und in der zweiten PCR eingesetzt. Im dritten PCR-Schritt wurde das mutierte MT I_{van} Gen in hoher Konzentration (Abb. 3-12 B) amplifiziert. Die Erzeugung von Punktmutanten mittels „overlap extension PCR“ wies deutliche Vorteile gegenüber der „Megaprimer-PCR“ auf. Der dritte PCR-Schritt zeigte lediglich eine einzige Bande von etwa 1000 bp (Abb. 3-12 B). Es wurde ohne Nebenreaktionen nur das MT I-Gen amplifiziert. Im Gegensatz zu den mittels Megaprimer-PCR erzeugten DNA-Fragmenten wurden durch die „overlap-extension-PCR“ hohe Ausbeuten der MT I-Gene beziehungsweise deren Fragmenten erzielt. Zudem wiesen alle sequenzierten Klone die gewünschte Mutation auf, so dass die Erzeugung von Punktmutanten beider Methyltransferasen deutlich vereinfacht wurde.

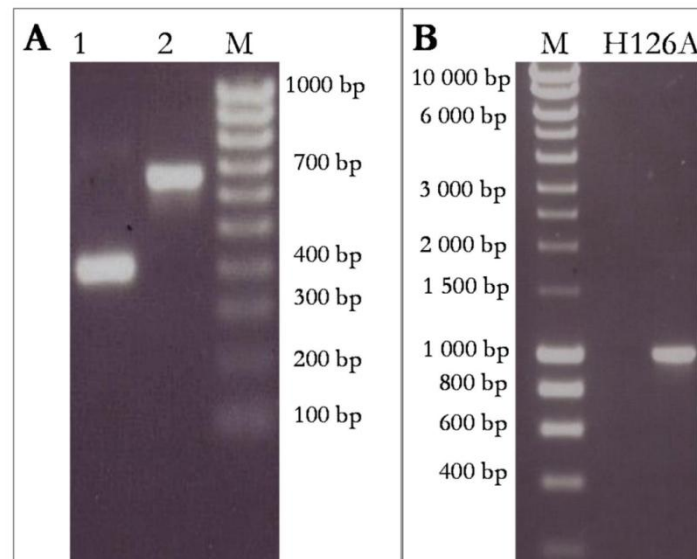


Abb. 3-12: Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben für die Erzeugung der Punktmutante MT I_{van} H126A mittels overlap-extension PCR. A: Erzeugung der mutierten Genfragmente. Spur 1: *NdeI*-H126A_R-Fragment; Spur 2: *H126A_F-Strep*-R-Fragment; M: Hyperladder IV. B: Erzeugung des kompletten Gens. M: Hyperladder I; H126A: *mt I_{van}* H126A.

3.2.2. Zinkbindemotiv der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase

Zink kann in Enzymen durch die Seitenketten von vier verschiedenen Aminosäuren, Histidin, Glutamat, Aspartat oder Cystein (Vallee und Auld 1990 b) gebunden werden. Bei katalytisch aktivem Zink erfolgt die Bindung von einem Molekül Zink über die Seitenketten von 3 Aminosäuren. Der Austausch eines der drei Zinkliganden führt dabei zu einem inaktiven Enzym, in dem Zink nicht mehr gebunden ist. Da in der Aminosäuresequenz von MT I_{ver} 62 dieser möglichen Liganden enthalten sind (Abb. 3-13, grau unterlegt), wurden zunächst die durch den Vergleich mit Bindemotiven anderer Alkyltransferasen übereinstimmende Aminosäuren untersucht. Enzyme, die eine ähnliche Funktion wie die untersuchten Methyltransferasen I der

1	MNQRENFFAMIEGKKPEFIPNSMEVYKTCVMATSIIIDSPFQGGLDAYGVN
51	WIATKEGSIPEPNKFMFNDITDWKDHVKFPNVDTLGIEEAAKMEADVKR
101	DEMVINVFSAACGLFERMAAFMGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRID
151	CHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSPKVYREVIKPAHQRIAEAVTS
201	RGVIFSQHTCGKCEEIVGDYVEMGAKIWHSAQISNDLEGIMDRYKGKLI
251	EGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS
301	LLVGDPRLPEPMLKAFNEINKL

Abb. 3-13: Aminosäuresequenz der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase. Die zur Zinkbindung befähigten Aminosäuren sind grau unterlegt. Die durch Punktmutation ausgetauschten Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase aufweisen (Cobalamin-abhängige Methioninsynthese von *Escherichia coli* oder die Methanol-Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri*), zeichnen sich durch Bindemotive aus, bei denen hauptsächlich Cysteinreste Zink binden (Hagemeier et al. 2006). Aus diesem Grund wurden zunächst diese Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht.

Die Aminosäuresequenz von MT I_{ver} beinhaltet 7 Cysteine (Abb. 3-13), welche durch „overlap-extension PCR“ gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die mutierten Enzyme wurden in *E. coli* BL21 (DE3) nach Optimierung der Induktionsbedingungen (Bedingungen siehe 2.5.4.) exprimiert, wobei nach der Induktion mit IPTG die Bildung großer Mengen von Protein mit der erwarteten molekularen Masse von 36 kDa (Abb. 3-14, Spur 2) erfolgte. Die mutierten Methyltransferasen wurden über Affinitätschromatographie an Strep-Tactin bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abb. 3-14, Spur 3).

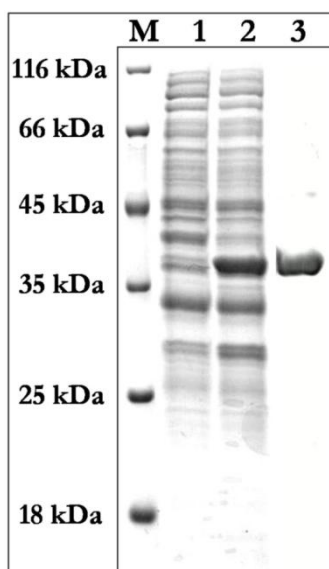


Abb. 3-14: SDS-PAGE nach Expression und Reinigung von MT I_{ver} C128A. Spur 1: Rohextrakt *E. coli* BL21 (DE3) pET11a MT I_{ver} C128A vor Induktion (5 µg). Spur 2: Rohextrakt nach Induktion (5 µg). Spur 3: gereinigtes Protein (1 µg). M: Proteinmarker.

Der Austausch von Cystein 277, welches in der Nähe des C-Terminus der Veratrol-Methyltransferase I lokalisiert ist, gegen Alanin führte zu keiner signifikanten Änderung der spezifischen Enzymaktivität (Tab. 3-3). Die Mutation hatte zudem keine Auswirkung auf das Substratspektrum des Enzyms. Alle Substrate, die MT I_{ver} umsetzen konnte, wurden auch von C277A mit ähnlichen spezifischen Aktivitäten verwertet. Die Mutation des Cysteins 29 gegen Alanin resultierte ebenfalls in einem Enzym, dessen Aktivität und Substratspektrum, mit Ausnahme von Vanillat und Isovanillat, nicht beeinflusst wurde. Beide Mutanten wiesen, ebenso wie das unmutierte Enzym, einen Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-3). Die spezifischen Aktivitäten der Mutanten C128A, C210A und C213A waren deutlich

reduziert und ungefähr 5-mal geringer als bei der unmutierten MT I_{ver}. C213A demethylierte dieselben Substrate wie MT I_{ver}, wohingegen C210A Vanillat und Isovanillat nicht mehr umsetzen konnte. C128A konnte neben Vanillat und Isovanillat auch Guajakol nicht mehr demethylieren (Tab. 3-3). Die mutierten Enzyme wiesen einen Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein auf.

Tab. 3-3: Bestimmung des Substratspektrums und des Zinkgehaltes der Cysteinpunktmutanten der MT I_{ver}. Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrat	Spezifische Aktivitäten (nkat/mg)					
	MT I _{ver}	C29A	C128A	C210A	C213A	C277A
Vanillat	0,32	0	0	0	0,13	0,67
Isovanillat	2,09	0,44	0	0	0,20	2,27
Syringat	1,04	1,74	0,38	0,15	0,23	1,05
Guajakol	1,52	1,31	0	0,25	0,25	1,55
Veratrol	3,29	2,53	0,62	0,65	0,68	2,88
3-Hydroxyanisol	3,93	3,07	0,18	0,69	0,71	3,19
2-Chloranisol	1,21	1,90	0,14	0,17	0,17	1,12
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0,44	1,41	1,24	0,40	0,33	1,41
Methanol	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,07	0,91 ± 0,01	0,97 ± 0,06	1,00 ± 0,03	0,99 ± 0,04

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/mol Protein)

Der Austausch der Cysteine an Position 111 und 151 gegen Alanin resultierte in Enzymen, welche keines der getesteten Substrate umsetzen konnten (Tab. 3-4). Der Zinkgehalt betrug 0,04 (C111A) bzw. 0,01 (C151A) mol Zink pro mol Protein. Da alle anderen Cysteinmutanten noch aktiv waren, muss es sich bei der dritten zinkbindenden Aminosäure um Histidin, Glutamat oder Aspartat handeln. Die Aminosäuresequenz von MT I_{ver} weist im N-terminalen Bereich viele Aspartat- und Glutamatreste (Abb. 3-13) auf, die ebenfalls durch „overlap-extension PCR“ gegen Alanin ausgetauscht wurden. Der Austausch des Aspartats an Position 83 gegen Alanin resultierte in einer inaktiven Mutante, die keines der getesteten Substrate demethylieren konnte und kein Zink mehr enthielt (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Bestimmung des Substratspektrums und des Zinkgehaltes der an der Zinkbindung beteiligten Aminosäuren von MT I_{ver}. Die Strukturformeln der eingesetzten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrat	Spezifische Aktivitäten (nkat/mg)			
	MT I _{ver}	D83A	C111A	C151A
Vanillat	0,32	0	0	0
Isovanillat	2,09	0	0	0
Syringat	1,05	0	0	0
Guajakol	1,52	0	0	0
Veratrol	3,29	0	0	0
3-Hydroxyanisol	3,93	0	0	0
2-Chloranisol	1,21	0	0	0
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0
Methylchlorid	0,44	0	0	0
Methanol	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,00 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/ mol Protein)

Cystein 151 ist neben Cystein 111 und Aspartat 83 eine der drei Aminosäuren, nach deren Austausch gegen Alanin kein Zink mehr im Enzym gebunden war. Für Cystein 151 wurden Kontrollmutanten erzeugt, da diese Aminosäure direkt von einem Histidin (Position 152) und einem Aspartat (Position 150, Abb. 3-13), die ebenfalls eine Zinkbindung vermitteln könnten, flankiert ist. Durch die Kontrollmutanten sollte die Bedeutung der Position und der Art der Aminosäure untersucht werden, die die Zinkbindung ermöglichen. Der Austausch von Cystein 151 gegen Aspartat, welches ebenfalls eine Zinkbindung vermitteln kann, führte zu einem inaktiven Enzym, welches keines der getesteten Substrate umsetzen konnte. Das mutierte Enzym wies einen Zinkgehalt von 0,07 mol Zink pro mol Protein (Tab. 3-5) auf. Der Austausch des Aspartats an Position 150 beziehungsweise des Histidins an Position 152 gegen Alanin führte in beiden Fällen zu Enzymen, die ein stark eingeschränktes Substratspektrum und deutlich reduzierte Aktivitäten aufwiesen (Tab. 3-5). Sowohl D150A als auch H152A wiesen einen Zinkgehalt von etwa 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-5). D150A konnte lediglich Veratrol und Methylchlorid demethylieren, wobei die Veratrol-Umsetzung um den Faktor 30 reduziert war. H152A konnte neben Veratrol und Methylchlorid auch 3-Hydroxyanisol und 2-Chloranisol als Substrat verwerten, jedoch war die Aktivität, außer für die Methylchlorid-Verwertung, ca.

30-mal geringer als die Aktivität der unmutierten Veratrol Methyltransferase I. Die Aktivität mit Methylchlorid als Substrat wurde durch die Mutation nicht reduziert. Das Substrat konnte im Vergleich zur unmutierten MT I_{ver} sogar besser umgesetzt werden. Als zusätzliche Kontrollmutanten wurden zwei Doppelmutanten erzeugt (D150C-C151A; H152C-C151A) bei denen das Cystein 151 gegen Alanin ausgetauscht und dafür ein Cystein an Position 150 beziehungsweise 152 eingefügt wurde. Beide Doppelmutanten waren inaktiv und wiesen einen Zinkgehalt von 0,08 mol (D150C-C151A) beziehungsweise 0,03 mol (H152C-C151A) Zink pro mol Protein auf.

Tab. 3-5: Substratspektrum und Zinkgehalt der Mutanten von Aspartat 150, Cystein 151 und Histidin 152 der MT I_{ver}. Die Strukturformeln der eingesetzten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrat	Spezifische Aktivitäten (nkat/mg)					
	MT I _{ver}	D150A	D150C ^a	C151D	H152A	H152C ^b
Vanillat	0,32	0	0	0	0	0
Isovanillat	2,09	0	0	0	0	0
Syringat	1,05	0	0	0	0	0
Guajakol	1,52	0	0	0	0	0
Veratrol	3,29	0,05	0	0	0,09	0
3-Hydroxyanisol	3,93	0	0	0	0,15	0
2-Chloranisol	1,21	0	0	0	0,23	0
3,4,5-TMB ^c	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0,44	1,07	0	0	1,76	0
Methanol	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^d	1,00 ± 0,04	0,96 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,03	1,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01

^a D150C_C151A ^b H152C_C151A ^c 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^d Zinkgehalt (mol Zink/ mol Protein)

Da die Mutanten, die kein Zink mehr aufwiesen, inaktiv waren, erfolgte der Nachweis der Enzyme mittels spezifischer, gegen MT I_{ver} gerichteter Antikörper im Western-Blot. Sowohl D83A als auch C111A und C151A (Abb. 3-15, Spur 1-3) konnten mit den MT I_{ver}-Antikörpern nachgewiesen werden. Auch für die Kontrollmutanten D150A, D150C-C151A, C151D, H152A und H152C-C151A konnte im Western-Blot (Abb. 3-15, Spur 4-8) eine spezifische Proteinbande von ungefähr 36 kDa nachgewiesen werden, was der apparenten molekularen Masse von MT I_{ver} entspricht.

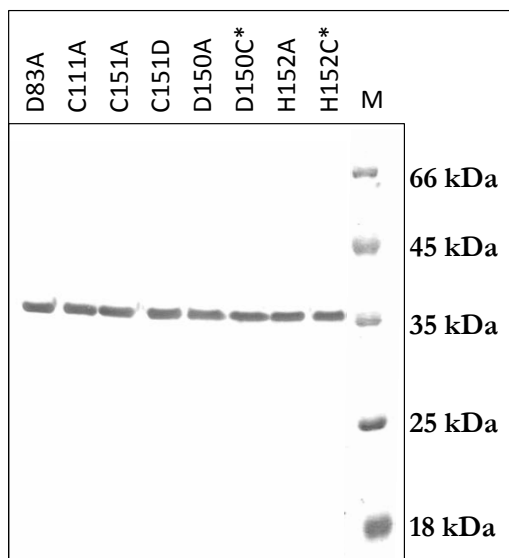


Abb. 3-15: Nachweis der Punktmutanten von MT I_{ver} mittels MT I_{ver} -spezifischen Antikörpern im Westernblot. Pro Spur wurden 100 ng gereinigte MT I_{ver} -Mutante aufgetragen.

* Doppelmutanten: D150C-C151A; H152C-C151A.

Im Bereich der Aminosäuren D83 und C111, nach deren Mutation kein Zink im Enzym gebunden war, sind eine Reihe von Aminosäuren mit sauren Seitengruppen lokalisiert (Abb. 3-13). Diese Seitengruppen begünstigen möglicherweise die O-Demethylierung, indem sie die elektrophile Wirkung des Zinks verstärken und die Etherbindung des Substrates polarisieren (siehe auch Hagemeier et al. 2006). Aus diesem Grund wurden Punktmutanten an diesen Positionen hergestellt, um eine mögliche Beeinflussung der Reaktion zu untersuchen. Der Austausch der Aspartate D94 und D101 sowie der Glutamate E88, E89, E94 und E102 gegen Alanin resultierte in Enzymen, deren Aktivität reduziert und deren Substratspektrum eingeschränkt war (Tab. 3-6). Alle Mutanten konnten Veratrol demethylieren, wobei die spezifische Aktivität je nach Mutante um den Faktor 3-7 reduziert war (Tab. 3-6). Die übrigen Substrate, mit Ausnahme von Methylchlorid, konnten abhängig von der jeweiligen Mutante nicht oder nur mit geringerer Aktivität umgesetzt werden (Tab. 3-6). Die Demethylierung von Methylchlorid wurde durch die Mutation nicht negativ beeinflusst. Die meisten Mutanten (mit Ausnahme von E102A, siehe Tab. 3-6) konnten dieses Substrat sogar besser umsetzen als die unmutierte MT I_{ver} . Alle Mutanten wiesen einen Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: Substratspektrum und Zinkgehalt der Aspartat- und Glutamatmutanten von MT I_{ver}. Die chemischen Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrate	Spezifische Aktivitäten (nkat/mg)						
	MT I _{ver}	E88A	E89A	E94A	D97A	D101A	E102A
Vanillat	0,32	0	0	0	0	0	0
Isovanillat	2,09	0	0	0	0	0	0
Syringat	1,05	0,42	0,29	0,14	0	0,05	0
Guajakol	1,52	0	0,26	0,14	0,06	0,30	0,05
Veratrol	3,29	0,75	0,67	0,52	0,95	0,97	0,42
3-Hydroxyanisol	3,93	0	0,27	0	0	0,76	0,05
2-Chloranisol	1,21	0,07	0,31	0	1,02	0,78	0,25
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0,44	1,58	1,06	0,92	1,54	1,12	0,50
Methanol	0	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,00 ± 0,04	0,90 ± 0,04	0,93 ± 0,03	1,01 ± 0,01	1,02 ± 0,06	0,98 ± 0,07	0,97 ± 0,01

^a 3,4,5-Trimethoxybezoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/ mol Protein)

3.2.3. Zinkbindemotiv der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase

Durch den Vergleich der bekannten Zinkbindemotive von Enzymen ähnlicher Funktion (siehe Einleitung Tab. 1-1) konnten keine übereinstimmenden Aminosäuren in der Sequenz von MT I_{van} nachgewiesen werden. Auch der Vergleich der MT I_{van}-Sequenz mit der von MT I_{ver} zeigte keine Übereinstimmung im Hinblick auf mögliche Zinkbindemotive von MT I_{van}. Lediglich der Vergleich der Distanzen zwischen den Zink-Bindepartnern der MT I_{ver} mit möglichen zinkbindenden Aminosäuren in MT I_{van} führte zu Übereinstimmungen (Abb. 3-16). Diese

1	MLTKRQNLVEVMKGGNPDRFVKQYEAFALMMKTPITRLKPPVGGSIW
51	GVTLSWPEGQLGSFPIHDKHEHIVIKDITKWRDYVKAPNLDYPDEAWATAV
101	ADANAVDRNDQYVTVFVAPGLF EHV HYLMSM EE ALMAYY EE PEAM HE LID
151	YLVD FE LRLAKE FI K HL HPDAVFHDDWGSQINSFISPA MFEE FFEPAYK
201	KIYGYKENGVELIIHHSDSYAANLVPSMI EM GIDIWQGVMTNNIP EL I
251	KQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EY VEKT CE ENGKLH F IPSQTS
301	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLF

Abb. 3-16: Aminosäuresequenz der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase. Die möglichen Zinkbindepertner sind grau unterlegt. Die durch Punktmutation ausgetauschten Aminosäuren sind fett hervorgehoben.

Aminosäuren wurden durch Punktmutation gegen Alanin ausgetauscht, um eine mögliche Beteiligung am Zinkbindemotiv zu untersuchen. Zusätzlich wurde auch das einzige in der Sequenz von MT I_{van} enthaltene Cystein mutiert, um dessen Bedeutung für die O-Demethylierung zu untersuchen. Die Aspartate an Position 102, 107 und 110 entsprachen in ihrer Position ungefähr dem Aspartat 83 der Veratrol-Methyltransferase I, nach dessen Austausch gegen Alanin kein Zink mehr im Enzym gebunden war. Der Austausch der Aspartate 107 beziehungsweise 110 gegen Alanin erzeugte Enzyme, die alle Substrate, welche die unmutierte MT I_{van} umsetzen konnte, ebenfalls demethylierten. Jedoch war die Aktivität um den Faktor 5 niedriger (Tab. 3-7). Auch D102A zeigte dasselbe Substratspektrum wie die unmutierte Methyltransferase MT I_{van}, jedoch war die Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen beiden Mutanten noch stärker (Faktor 10) reduziert. Alle drei Aspartatmutanten wiesen einen Zinkgehalt von ca. 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-7).

Tab. 3-7: Bestimmung des Substratspektrums und des Zinkgehaltes der Aspartat- und Histidin-Punktmutanten von MT I_{van}. Die Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrat	spezifische Aktivität (nkat/mg)							
	MT I _{van}	D102A	D107A	D110A	D150A	D154A	H124A	H126A
Vanillat	2,43	0,13	0,50	0,55	0,46	0,70	0,30	0,10
Isovanillat	5,82	0,25	0,38	0,15	0,59	0,51	0,59	0,20
Syringat	2,43	0,17	0,46	0,55	0,51	0,53	0,20	0,06
Guajakol	1,26	0,07	0,28	0,46	0,23	0,28	0,27	0,05
Veratrol	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Hydroxyanisol	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Chloranisol	0	0	0	0	0	0	0	0
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0	0	0	0	0	0	0	0
Methanol	0	0	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,02 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,94 ± 0,05	0,98 ± 0,03	0,94 ± 0,03	1,00 ± 0,01

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/mol Protein)

Die beiden Histidine H124 und H126 entsprechen in ihrer Position in der Struktur von MT I_{van} ungefähr dem C111 von MT I_{ver}. Der Austausch der beiden Aminosäuren gegen Alanin erzeugte Mutanten, die eine 10-20-fach geringere Aktivität aufwiesen als das unmutierte Enzym. Das

Substratspektrum war hingegen unverändert (Tab. 3-7). Beide Mutanten wiesen einen Zinkgehalt von ca. 1 mol Zink pro mol Protein auf. Der Austausch der beschriebenen Histidine und Aspartate gegen Alanin führte in allen Fällen zu Enzymen, die Zink noch gebunden hatten (Tab. 3-7). Auch die Mutation von D150 und D154 erzeugte Enzyme, deren Aktivität reduziert war. Die Zinkbindung wurde jedoch nicht beeinflusst (Tab. 3-7). Die Glutamatmutanten E123, E140, E141, E143, E156 und E162 wiesen nach dem Austausch der Aminosäure gegen Alanin noch einen Zinkgehalt von etwa 1 mol Zink pro mol Protein auf. Die Enzymaktivitäten waren hingegen reduziert (Tab. 3-8). Die Mutation des Cysteins C286 erzeugte ein Enzym, dessen Aktivität um den Faktor 5 reduziert war, welches jedoch dasselbe Substratspektrum wie die unmutierte MT I_{van} aufwies (Tab. 3-8). Es konnte ein Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein bestimmt werden.

Tab. 3-8: Substratspektrum und Zinkgehalt der Glutamat- und Cystein-Punktmutanten von MT I_{van}. Die Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: Aktivität ≤ 0,01 nkat/mg.

Substrat	spezifische Aktivität (nkat/mg)							
	MT I _{van}	E123A	E140A	E141A	E143A	E156A	E162A	C286A
Vanillat	2,43	0,18	0,14	1,08	0,84	0,37	0,22	0,63
Isovanillat	5,82	0,20	0,15	0,68	0,54	0,28	0,32	1,18
Syringat	2,43	0,13	0,15	0,71	0,66	0,37	0,23	0,30
Guajakol	1,26	0,19	0,11	0,88	0,46	0,17	0,10	0,33
Veratrol	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Hydroxyanisol	0	0	0	0	0	0	0	0
2-Chloranisol	0	0	0	0	0	0	0	0
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0	0	0	0	0	0	0	0
Methanol	0	0	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,02 ± 0,01	0,96 ± 0,01	1,00 ± 0,06	1,03 ± 0,04	1,02 ± 0,04	0,97 ± 0,04	0,99 ± 0,09	0,98 ± 0,01

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/mol Protein)

Der Austausch der Glutamate 132 und 147 sowie des Histidins an Position 168 resultierte in inaktiven Enzymen, die keines der getesteten Substrate umsetzen konnten (Tab. 3-9). Die Mutanten wiesen einen Zinkgehalt von 0,04 bis 0,06 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-9). Bei allen drei Mutanten sind in direkter Nachbarschaft (Abb. 3-16) Aminosäuren lokalisiert, die

ebenfalls potentiell zur Zinkbindung befähigt sind. Der Austausch dieser Aminosäuren (E133, H146 und H166) gegen Alanin führte zu Enzymen, deren Aktivität stark reduziert war. Alle drei Enzyme wiesen jedoch einen Zinkgehalt von rund 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-9).

Tab. 3-9: Substratspektrum und Zinkgehalt der zinkbindenden Aminosäuren und deren Umgebung. Die Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Kapitel 3.3.1. dargestellt. 0: spezifische Aktivität $\leq 0,01$ nkat/mg.

Substrat	spezifische Aktivität (nkat/mg)						
	MT I _{van}	E132A	E133A	H146A	E147A	H166A	H168A
Vanillat	2,43	0	0,02	0,35	0	0,23	0
Isovanillat	5,82	0	0,06	0,17	0	0,44	0
Syringat	2,43	0	0,04	0,23	0	0,38	0
Guajakol	1,26	0	0,04	0,28	0	0,19	0
Veratrol	0	0	0	0	0	0	0
3-Hydroxyanisol	0	0	0	0	0	0	0
2-Chloranisol	0	0	0	0	0	0	0
3,4,5-TMB ^a	0	0	0	0	0	0	0
Methylchlorid	0	0	0	0	0	0	0
Methanol	0	0	0	0	0	0	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0	0
Zinkgehalt ^b	1,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	1,04 ± 0,03	1,02 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,98 ± 0,02	0,06 ± 0,01

^a Aktivität $\leq 0,01$ nkat/mg ^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b Zinkgehalt (mol Zink/mol Protein)

Da für die Mutanten E132A, E147A und H168A keine demethylierende Aktivität bestimmt werden konnte, erfolgte zusätzlich der Nachweis der mutierten Enzyme mittels spezifischer MT I_{van}-Antikörper im Western-Blot (Abb. 3-17). Zudem wurden auch die Kontrollmutanten E133A, H146A und H166A aufgetragen. Für alle Enzyme konnte eine spezifische Proteinbande mit einer apparenten molekularen Masse von 37 kDa nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Molekulargewicht der unmutierten rekombinanten MT I_{van}.

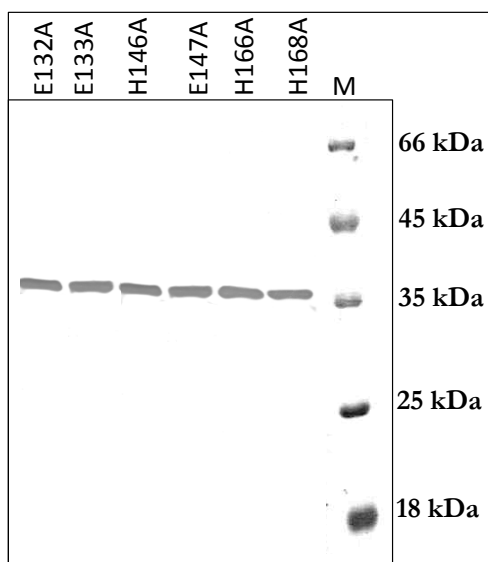


Abb. 3-17: Nachweis der Punktmutanten von MT I_{van} mittels MT I_{van}-spezifischer Antikörper im Western-Blot. Von den gereinigten Punktmutanten wurden jeweils 100 ng aufgetragen.

3.3. Erzeugung und Charakterisierung von Deletionsmutanten

Obwohl die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase die gleiche Reaktion katalysieren, unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Aminosäuresequenz. Die durch Vorhersageprogramme prognostizierten Sekundärstrukturen der beiden Enzyme zeigen beide am C-Terminus eine TIM-Barrel Struktur (Abb. 3-8). Der N-Terminus ist hingegen strukturell verschieden. Da sich auch die Substratspektren der beiden Enzyme unterscheiden, sollte mit Hilfe von N-terminalen Deletionsmutanten der Einfluss des N-Terminus auf die Aktivität und das Substratspektrum untersucht werden. Die Mutanten wurden mittels PCR durch die Kombination des im Gen ansetzenden Forward-Primers und einem das Gen am 3' Ende flankierenden Reverse-Primer erzeugt (siehe Material und Methoden Kapitel 2.5.3.). Die Mutanten wurden hinsichtlich ihres Substratspektrums und des Zinkgehalts untersucht.

3.3.1. Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase

Die strukturelle Zuordnung der Vanillat-Methyltransferase I zur Gruppe der TIM-Barrel Enzyme erfolgte mittels computerbasierenden Analysen. Anhand dieser Vorhersage und dem daraus entwickelten Modell wird für die ersten 100-120 Aminosäuren angenommen, dass sie nicht zur TIM-Barrel-Struktur gehören, sondern als Abfolge von α -Helices diese umgeben. Da der N-terminale Bereich des Enzyms zudem im Vergleich mit der Struktur der MT I_{ver} den variablen Teil des Enzyms darstellt, bestand die Vermutung, dass der N-Terminus die Substratspezifität

bestimmt. Basierend auf der Strukturvorhersage (Abb. 3-18) wurden mittels verschiedener Deletionsmutanten schrittweise die mutmaßlichen α -Helices beziehungsweise das β -Faltblatt abgeschnitten, um ihren Einfluss auf die Enzymaktivität und Substratspezifität zu untersuchen.

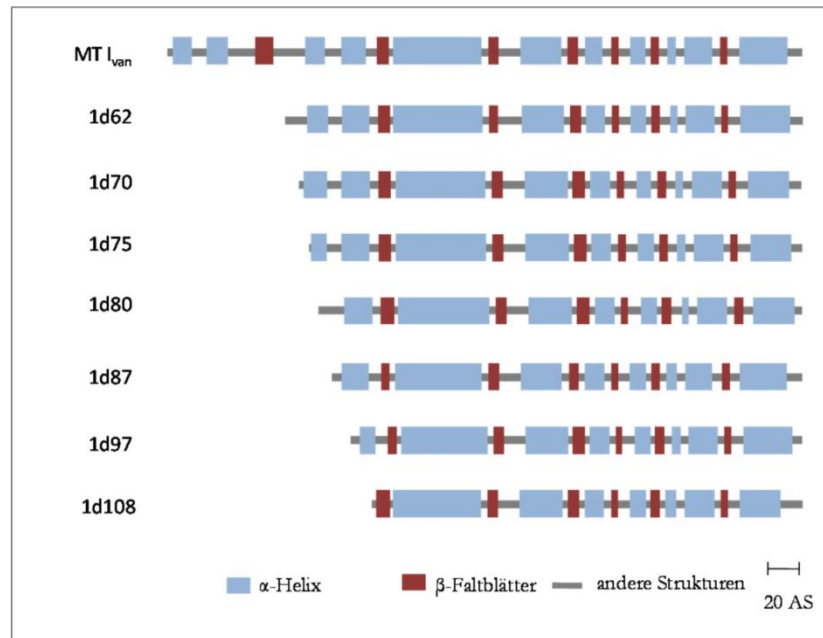


Abb. 3-18: Analyse der Sekundärstrukturen der MT I_{van} und deren Deletionsmutanten. Die Vorhersage der Sekundärstrukturen erfolgte mittels Quickphyre (Bennett-Lovsey et al. 2008).

Die Expression der deletierten MT I_{van} -Gene erfolgte, mit Ausnahme von MT I_{van} 1d87, in *E. coli* BL21 (DE 3). Für die Untersuchung der Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 wurde das deletierte Gen zunächst in den Expressionsvektor pET 11a kloniert. Anschließend wurde unter Verwendung verschiedener Expressionsstämme (*E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* TB 1 und *E. coli* B834) und variierender Induktionsbedingungen die Expression untersucht. Jedoch konnte in den Rohextrakten der induzierten Kulturen keine Bildung der Deletionsmutante nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich die Verwendung von *E. coli* BL21 (DE 3) pRIL ermöglichte die Expression des deletierten Gens. Jedoch konnte, trotz umfangreicher Optimierungsversuche der Induktionsbedingungen, nur eine geringfügige Bildung von löslichem Enzyms erreicht werden (Daten nicht gezeigt), so dass eine andere Klonierungsstrategie gewählt wurde. Das deletierte MT I_{van} -Gen wurde unter Nutzung der Restriktionsstellen NdeI und BamHI in den Expressionsvektor pJOE2702 kloniert. Die Expression des deletierten Gens erfolgte in *E. coli* JM 109. Durch die Induktion mit Rhamnose (Induktionsbedingungen siehe 2.5.4.) konnte lösliches Protein in ausreichenden Mengen gebildet werden (Abb. 3-19, Spur 1 und 2).

Die Reinigung dieser Deletionsmutante gestaltete sich ebenfalls schwierig. Zwar konnte das Enzym durch eine Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) angereichert werden, weitere Reinigungsschritte durch hydrophobe Interaktion (Phenyl-Superose, Phenyl-Sepharose) gelangen jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). Auch die Reinigung durch Affinitätschromatographie unter Nutzung des C-terminalen Strep-Tags war nicht erfolgreich. Ebenso wenig konnte eine Aufreinigung unter Nutzung einer Anti-MT^{I_{van}}-gekoppelten Sepharose-Säule erzielt werden. Als einzige erfolgreiche Reinigungsstrategie konnte die Gelpermeationschromatographie etabliert werden. Der Rohextrakt der Mutante wurde zunächst auf eine Superdex 75 Säule aufgetragen (Bedingungen siehe Kapitel 2.6.3.). Fraktionen, die MT^{I_{van}} 1d87 enthielten, (Abb. 3-19, Spur 3) wurden vereinigt, ankonzentriert (500 µl Endvolumen) und auf eine zweite Gelfiltrationssäule (Superdex 200, siehe Kapitel 2.6.3.) aufgetragen. Durch die zweite Gelfiltration konnte die Deletionsmutante bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden (Abb. 3-19, Spur 4). Alle anderen Deletionsmutanten wurden ebenfalls durch die Kombination von zwei Gelfiltrationsschritten gereinigt.

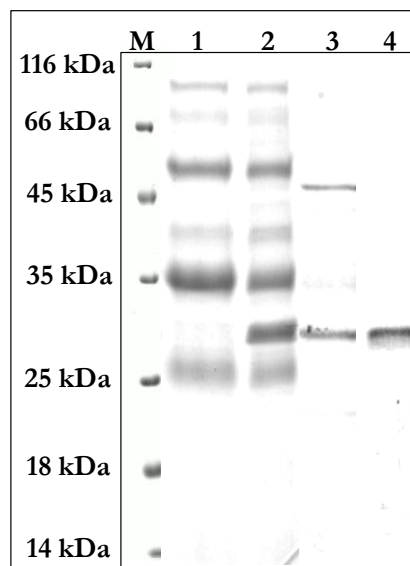


Abb. 3-19: SDS-PAGE der Reinigung der Deletionsmutante MT^{I_{van}} 1d87. Spur 1: Rohextrakt *E. coli* JM109 pJOE2702 MT^{I_{van}} 1d87 vor Induktion (5 µg); Spur 2: Rohextrakt nach Induktion (5 µg); Spur 3: 1. Reinigungsschritt Superdex 75 (0,5 µg); Spur 4: 2. Reinigungsschritt Superdex 200 (0,5 µg).

Die Deletionsmutanten wurden, ebenso wie die erzeugten Punktmutanten, hinsichtlich ihres Substratspektrums untersucht. Dafür wurden neben verschiedenen Phenylmethylethern (Abb. 3-20) auch Thioether und Ether wie Methionin oder Diethylether eingesetzt.

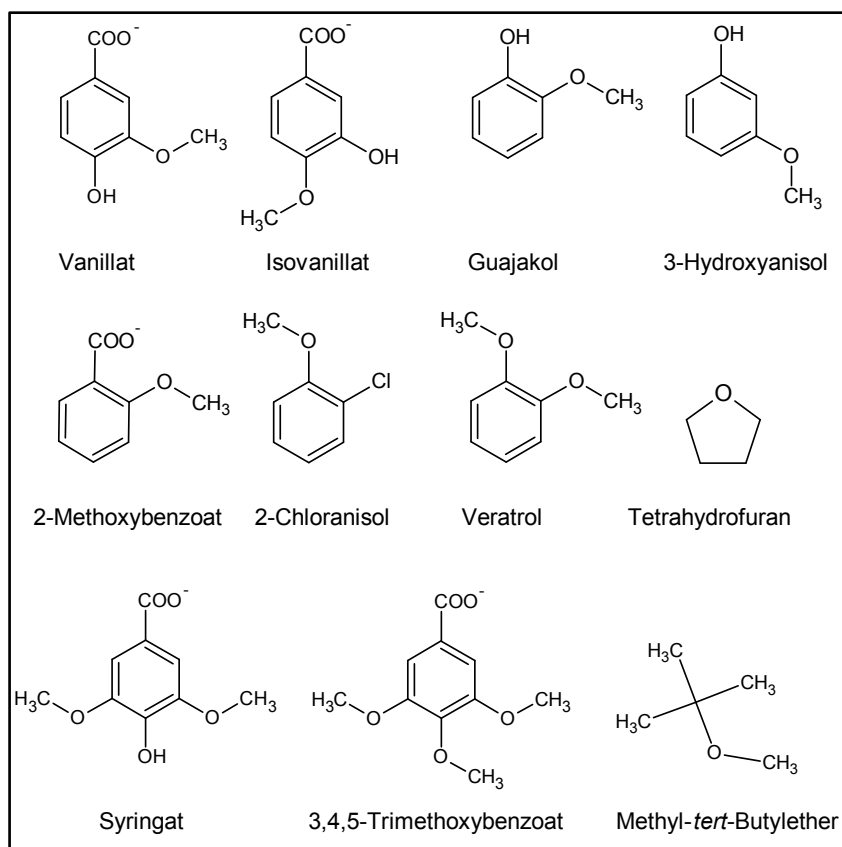


Abb. 3-20: Chemische Strukturformeln der Phenylmethylether, verzweigten und zyklischen Ether. Die Verbindungen wurden als Substrate der Methyltransferasen I eingesetzt.

Durch die Entfernung der ersten 62 Aminosäuren (MT I_{van} 1d62), wodurch zwei mutmaßliche α -Helices und das N-terminale β -Faltblatt abgeschnitten wurden (Abb. 3-19), erfolgte eine leichte Steigerung der Aktivität um den Faktor 2 für Vanillat als Substrat (Tab. 3-10). Die Mutante konnte wie die normale MT I_{van} Vanillat, Isovanillat, Syringat und Guajakol umsetzen. Alle anderen eingesetzten Substrate wurden nicht demethyliert.

Für die Erzeugung der Mutante 1d70 wurde die Methyltransferase I unmittelbar vor der dritten mutmaßlichen α -Helix geschnitten (Abb. 3-18). Die Aktivität dieser Mutante war deutlich erhöht (Faktor 5-10, Tab. 3-10). Zudem konnte das Enzym mit 3-Hydroxyanisol, 2-Methoxybenzoat und Methylchlorid Substrate umsetzen (Tab. 3-10), die sie ihrer unmutierten Form nicht demethylieren kann, die aber der Veratrol-Methyltransferase I als Substrat dienen. Außerdem konnte mit Methanol ein Substrat genutzt werden, welches von beiden unmutierten Methyltransferasen I nicht demethyliert werden konnte. Die dritte mutmaßliche α -Helix wurde durch die Deletionsmutante 1d75 verkürzt und durch die Mutante 1d80 vollständig entfernt (Abb. 3-18). In beiden Fällen zeigte sich, wie auch bei 1d70, ein stark verändertes Substratspektrum (Tab. 3-10). Beide Mutanten konnten neben 3-Hydroxyanisol, 2-Methoxybenzoat, Methanol und Methylchlorid auch 2-Chloranisol demethylieren, welches

eigentlich nur der unmutierten MT I_{ver} als Substrat dient. Außerdem waren die spezifischen Aktivitäten beider deletierter Enzyme deutlich erhöht (Faktor 10, Tab. 3-10).

Die Mutante MT I_{van} 1d87, bei der kurz vor der vierten mutmaßlichen α -Helix am N-Terminus der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase die ersten 87 Aminosäuren abgeschnitten wurden, war ebenfalls aktiv. Dieses verkürzte Enzym war mit Vanillat als Substrat ungefähr 17-mal aktiver als die unmutierte MT I_{van} (Tab. 3-10). Diese Aktivitätssteigerung wurde für alle Substrate, die auch die unmutierte MT I_{van} umsetzen konnte, beobachtet. Die Aktivität des deletierten Enzyms war auch mit Isovanillat, Guajakol und Syringat um den Faktor 10-20 erhöht. Zudem konnte die Mutante Substrate demethylieren, die von der unmutierten MT I_{van} nicht, dafür aber von der MT I_{ver} umgesetzt wurden. Die Umsetzung von 3-Hydroxyanisol, 2-Chloranisol, 2-Methoxybenzoat und Methylchlorid durch MT I_{van} 1d87 erfolgte, im Vergleich zu MT I_{ver} , mit einer 20-40-mal höheren spezifischen Aktivität. Zusätzlich konnte die Deletionsmutante Substrate umsetzen, die von keiner der beiden unmutierten Methyltransferasen I demethyliert werden konnten. Dazu zählten 3,4,5-Trimethoxybenzoat, Methanol, Methionin und Diethylether. 3,4,5-Trimethoxybenzoat und Methanol wurden mit einer ähnlichen spezifischen Aktivität wie Guajakol und Methylchlorid umgesetzt. Methionin und Diethylether hingegen wurden, im Verhältnis zu den anderen Substraten der MT I_{van} 1d87, nur mit sehr schlechten Raten demethyliert. Die spezifische Aktivität war 20-mal niedriger als mit Vanillat als Substrat (Tab. 3-10). Veratrol und Methylamin wurden als einzige der getesteten Substrate nicht demethyliert. Obwohl diese Deletionsmutante ein deutlich vergrößertes Substratspektrum aufwies, wurden zyklische Ether wie Tetrahydrofuran nicht gespalten. Auch Dichlormethan konnte, ebenso wie der stark verzweigte Methyl-*tert*-Butylether, nicht als Substrat genutzt werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Verkürzung der vierten mutmaßlichen Helix (Deletionsmutanten 1d89, 1d91 und 1d97) führte zu einer schrittweisen Abnahme der Aktivität. Die um zwei Aminosäuren kürzere Mutante MT I_{van} 1d89 wies ebenso wie MT I_{van} 1d87 ein verändertes Substratspektrum auf (Tab. 3-10). Die spezifische Aktivität der Mutante MT I_{van} 1d89 wurde jedoch nicht so deutlich gesteigert wie bei der Deletion von 87 Aminosäuren. So wurden Vanillat, Syringat und Guajakol nur noch doppelt so schnell umgesetzt wie vom unmutierten Enzym. Die Isovanillat-Verwertung hingegen wurde nur geringfügig gesteigert (Tab. 3-10). Auch die Demethylierung der anderen Substrate wurde im Vergleich zur Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 deutlich reduziert. Eine weitere Verkürzung der MT I der Vanillat-O-Demethylase um zwei Aminosäuren (MT I_{van} 1d91) erzeugte eine Mutante, die nur die Substrate der MT I_{van} demethylieren konnte. Zudem waren die spezifischen Aktivitäten um den Faktor 10 niedriger als die Enzymaktivität der unmutierten

MT I_{van} (Tab. 3-10). Eine weitere Verkürzung der vierten mutmaßlichen Helix (MT I_{van} 1d97) führte zu einer deutlichen Abnahme der Enzymaktivität (Faktor 20-70, Daten nicht gezeigt). Die komplette Entfernung der vierten mutmaßlichen Helix (MT I_{van} 1d108) resultierte in einem vollständig inaktiven Enzym, das keines der getesteten Substrate demethylieren konnte (Daten nicht gezeigt). Alle Deletionsmutanten, mit Ausnahme von MT I_{van} 1d108, wiesen einen Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Protein auf (Tab. 3-10). Die Zinkkonzentration von MT I_{van} 1d108 betrug 0,05 mol Zink pro mol Protein (Daten nicht gezeigt).

Tab. 3-10: Bestimmung des Substratspektrums und des Zinkgehaltes der Deletionsmutanten der Vanillat-Methyltransferase I. Die Strukturformeln der getesteten Phenylmethylether sind in Abb. 3-21 dargestellt. 0: spezifische Aktivität ≤0,01 nkat/mg.

Substrate	spezifische Aktivität (nkat/mg)							
	MT I _{van}	1d62	1d70	1d75	1d80	1d87	1d89	1d91
Vanillat	2,43	4,48	14,60	20,05	18,99	41,52	4,62	0,22
Isovanillat	5,82	4,85	33,76	29,89	22,86	55,40	7,16	0,61
Syringat	2,43	4,48	27,26	29,37	34,47	55,40	3,58	0,17
Guajakol	1,26	1,64	11,86	16,20	17,87	26,86	4,71	0,17
Veratrol	0	0	0	0	0	0	0	0
3-Hydroxyanisol	0	0	6,33	5,45	8,09	69,19	1,14	0
2-Chloranisol	0	0	0	6,01	7,85	55,40	1,04	0
2-Methoxybenzoat	0	n.b. ^a	5,45	8,09	8,62	42,20	n.b.	n.b.
3,4,5-TMB ^b	0	0	0	0	0	23,06	1,64	0
Methylchlorid	0	0	4,11	7,12	12,03	17,76	2,00	0
Methanol	0	0	7,74	8,97	9,67	23,52	1,16	0
Methylamin	0	0	0	0	0	0	0	0
Methionin	0	0	0	0	0	2,30	n.b.	n.b.
Diethylether	0	0	0	0	0	3,50	n.b.	n.b.
Zinkgehalt (mol Zink/mol Protein)	1,02 ± 0,01	0,98 ± 0,04	0,98 ± 0,10	1,00 ± 0,08	0,94 ± 0,01	0,99 ± 0,01	1,04 ± 0,03	0,98 ± 0,01

^a nicht bestimmt ^b 3,4,5-Trimethoxybenzoat

Die Deletionsmutanten wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen MT I_{van} nachgewiesen. Für alle Enzyme wurde eine Proteinbande entsprechend des erwarteten jeweiligen apparenten Molekulargewichts detektiert (Abb. 3-21).

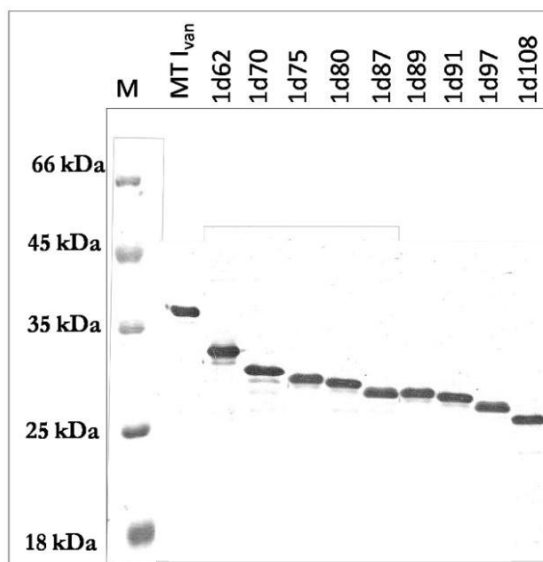


Abb. 3-21: Nachweis der Deletionsmutanten von MT I_{van} mittels spezifischer MT I_{van} -Antikörper im Western Blot. Von den gereinigten Proteinen wurden jeweils 100 ng aufgetragen.

Da die Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 ein verändertes Substratspektrum und deutlich erhöhte spezifische Aktivitäten aufwies (Tab. 3-10), wurde diese Mutante sowie die unmutierten Enzyme MT I_{van} und MT I_{ver} hinsichtlich ihrer K_m - und V_{max} -Werte enzymkinetisch charakterisiert.

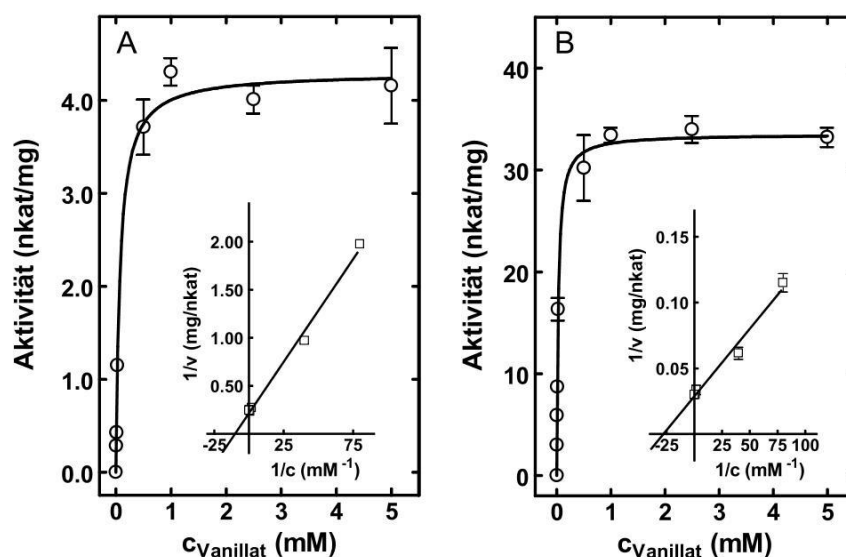


Abb. 3-22: Bestimmung der apparenten K_m - und V_{max} -Werte für Vanillat. A: MT I_{van} . B: MT I_{van} 1d87. Die Aktivität der Methyltransferase I wurde als Funktion der Vanillat-Konzentration mit einer Corrinoidprotein-Konzentration von 50 μ M dargestellt. Die Insets zeigen die zugehörigen Lineweaver-Burk-Plots. Der Reaktionsansatz enthielt 50 μ M CP; 2 mM ATP; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 μ g AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 μ M MT I.

Zunächst erfolgte die Bestimmung der apparenten Enzymparameter für MT I_{van} und MT I_{van} 1d87 in Abhängigkeit der Vanillat-Konzentration. Die Konzentration des zweiten Substrates des

Enzyms, das Corrinoidprotein, wurde konstant bei 50 μM gehalten. Der apparente K_m -Wert der unmutierten Vanillat-Methyltransferase I betrug 98,3 μM Vanillat mit einem V_{\max} -Wert von 4,6 nkat/mg (Abb. 3-22 A). Der für die Deletionsmutante 1d87 bestimmte apparente K_m -Wert betrug 35,7 μM Vanillat mit einem V_{\max} von 34,8 nkat/mg (Abb. 3-22 B). Die Berechnung der Enzymparameter erfolgte über den Lineweaver-Burk-Plot. Die Deletionsmutante 1d87 war im Gegensatz zu MT I_{van} in der Lage, neben Vanillat, Isovanillat, Syringat und Guajakol auch andere Substrate wie zum Beispiel 3-Hydroxyanisol zu demethylieren. Aus diesem Grund wurde für 3-Hydroxyanisol ebenfalls die Bestimmung der K_m - und V_{\max} -Werte durchgeführt. Als Vergleich wurde hierbei die Veratrol-Methyltransferase I herangezogen, da diese im Gegensatz zu MT I_{van} 3-Hydroxyanisol umsetzen konnte. Die Messung der MT I-Aktivität in Abhängigkeit der 3-Hydroxyanisol-Konzentration erfolgte bei einer konstanten Konzentration von 50 μM Corrinoidprotein. Für die Veratrol-Methyltransferase I wurde ein apparter K_m -Wert von 65,3 μM 3-Hydroxyanisol und ein V_{\max} -Wert von 2,9 nkat/mg bestimmt (Abb. 3-23 A). Der K_m -Wert der Deletionsmutante lag bei 38,5 μM 3-Hydroxyanisol und der V_{\max} -Wert bei 38,5 nkat/mg (Abb. 3-23 B). Die Berechnung der Enzymparameter erfolgte über den Lineweaver-Burk-Plot.

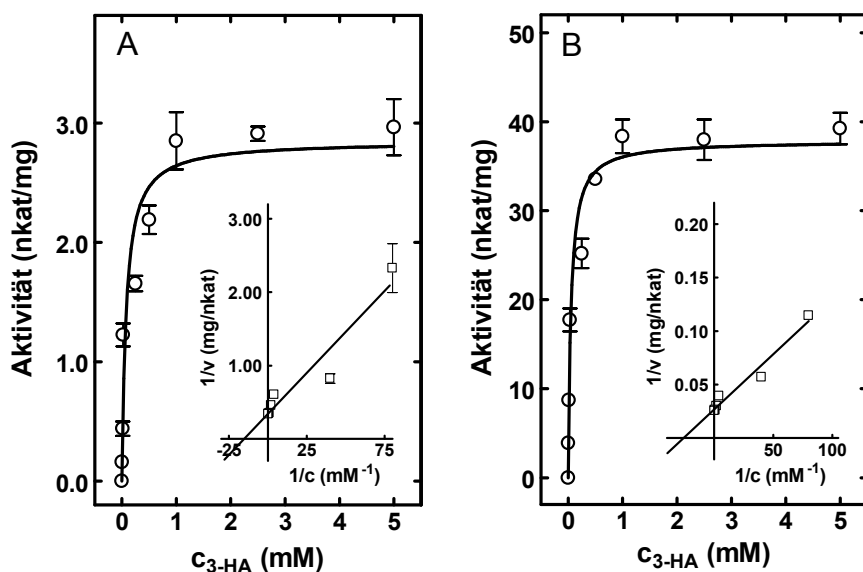


Abb. 3-23: Bestimmung der apparenten K_m -Werte für 3-Hydroxyanisol. A: MT I_{ver}. B: MT I_{1d87}. Die Aktivität der Methyltransferase I wurde als Funktion der 3-Hydroxyanisol-Konzentration mit einer Corrinoidprotein-Konzentration von 50 μM dargestellt. Die Insets zeigen die dazugehörigen Lineweaver-Burk-Plots. 3-HA= 3-Hydroxyanisol. Der Reaktionsansatz enthielt 50 μM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 μg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 μM MT I.

Neben Vanillat und 3-Hydroxyanisol wurde zudem Syringat als zusätzliches Substrat gewählt, da dieser Phenylmethylether von beiden Methyltransferasen I demethyliert werden konnte. Daher wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Syringat-Konzentration (Abb. 3-24) für

MT I_{van}, MT I_{ver} und die Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 bestimmt. Die Corrinoideprotein-Konzentration war konstant und betrug 50 µM. Die Berechnung der K_m- und V_{max}-Werte erfolgte über den Lineweaver-Burk-Plot (Abb. 3-24 Insets). Für die unmutierte MT I_{van} wurde ein K_m-Wert von 83,1 µM Syringat und ein V_{max} von 2,7 nkat/mg bestimmt. Der apparente K_m-Wert der Veratrol-Methyltransferase I lag mit 78,7 µM Syringat in einem ähnlichen Größenbereich. Der V_{max}-Wert betrug hingegen nur 1,21 nkat/mg. Der K_m-Wert der Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 war, ebenso wie mit Vanillat und 3-Hydroxyanisol als Substrat, niedriger als für die beiden unmutierten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase und betrug 59,9 µM Syringat. Der bestimmte V_{max}-Wert betrug 63,1 nkat/mg.

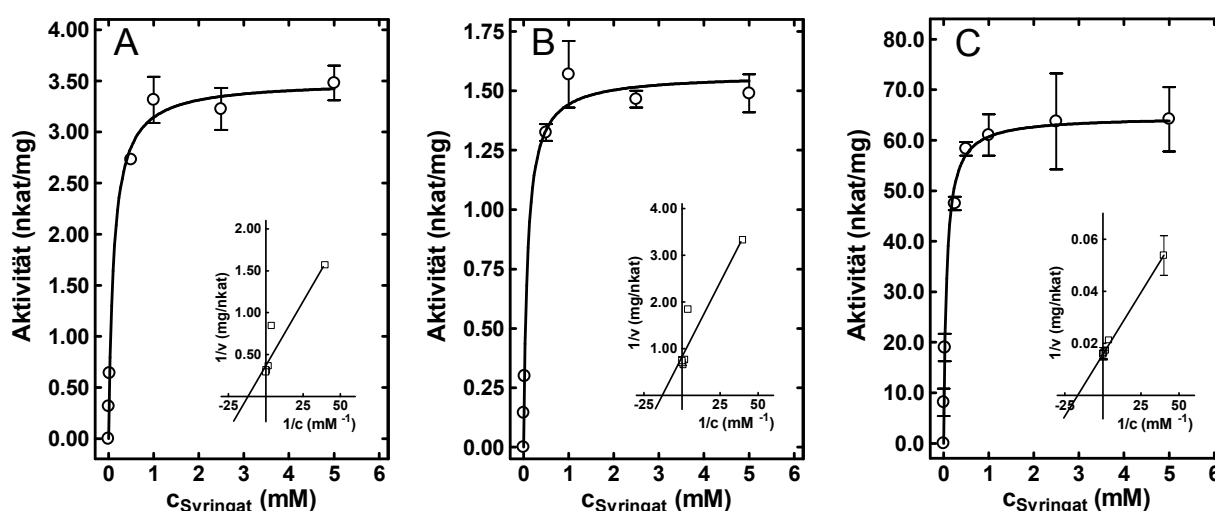


Abb. 3-25: Bestimmung der apparenten K_m-Werte für Syringat. Die Messungen wurden mit einer Corrinoide-Konzentration von 50 µM durchgeführt. Die Insets zeigen die Lineweaver-Burk-Auftragung der Messwerte. A: MT I_{van}. B: MT I_{ver}. C: MT I_{van} 1d87. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µM CP; 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 µg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 µM MT I.

Die Methyltransferase I benötigt für die von ihr katalysierte Reaktion neben den methoxylierten Verbindungen ein zweites Substrat, das Corrinoideprotein, welches durch die MT I methyliert wird. Für beide unmutierten Methyltransferasen I sowie für die Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Corrinoideprotein-Konzentration bei einer konstanten Konzentration von 5 mM Vanillat (MT I_{van} und MT I_{van} 1d87) beziehungsweise 3-Hydroxyanisol (MT I_{ver}) bestimmt (Abb. 3-25). Bei keiner Messung wurde eine Substratsättigung des Enzyms mit dem Corrinoideprotein erreicht. Als höchste Konzentration wurde 175 µM Corrinoide-Protein eingesetzt. Höher konzentrierte Proben wurden mittels der beschriebenen Reinigungsstrategie (siehe 2.6.2.) nicht erreicht. Keines der drei Enzyme folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Kurven zeigten einen sigmoidalen Verlauf (Abb. 3-25). Die Auftragung im Hill-Plot ergab eine lineare Abhängigkeit der Aktivität von der

Substratkonzentration (Insets in Abb. 3-25). Für alle drei Enzyme wurde ein Hill-Koeffizient von $n = 2,7-2,8$ bestimmt. Für beide unmutierten Methyltransferasen MT I_{van} und MT I_{ver} wurde dabei die gleiche Beeinflussung der Enzymaktivität durch die steigende Konzentration an Corrinoide-Protein nachgewiesen (Abb. 3-25 A und B). Mit der höchsten CP- Konzentration (175 μM) wurde für MT I_{van} eine spezifische Aktivität von 20,6 nkat/mg bestimmt. Für MT I_{ver} betrug die Aktivität mit 175 μM CP 12,1 nkat/mg. Die Enzymaktivitäten beider Methyltransferasen I wurden, im Vergleich zu den Aktivitäten die im Reaktionsansatz mit 50 μM CP bestimmt wurden, durch die Erhöhung der Corrinoideprotein-Konzentration um den Faktor 3 (MT I_{ver}) beziehungsweise um den Faktor 8 (MT I_{van}) gesteigert. Auch die Deletionsmutante zeigte mit Ausnahme der deutlich höheren spezifischen Aktivität die gleiche Beeinflussung der Enzymaktivität durch die veränderte Corrinoideprotein-Konzentration (Abb. 3-25 C). Die spezifische Aktivität der Deletionsmutante wurde durch die höhere CP- Konzentration (175 μM) um den gleichen Faktor (8-fach höhere Aktivität) gesteigert wie die Aktivität der unmutierten MT I_{van}.

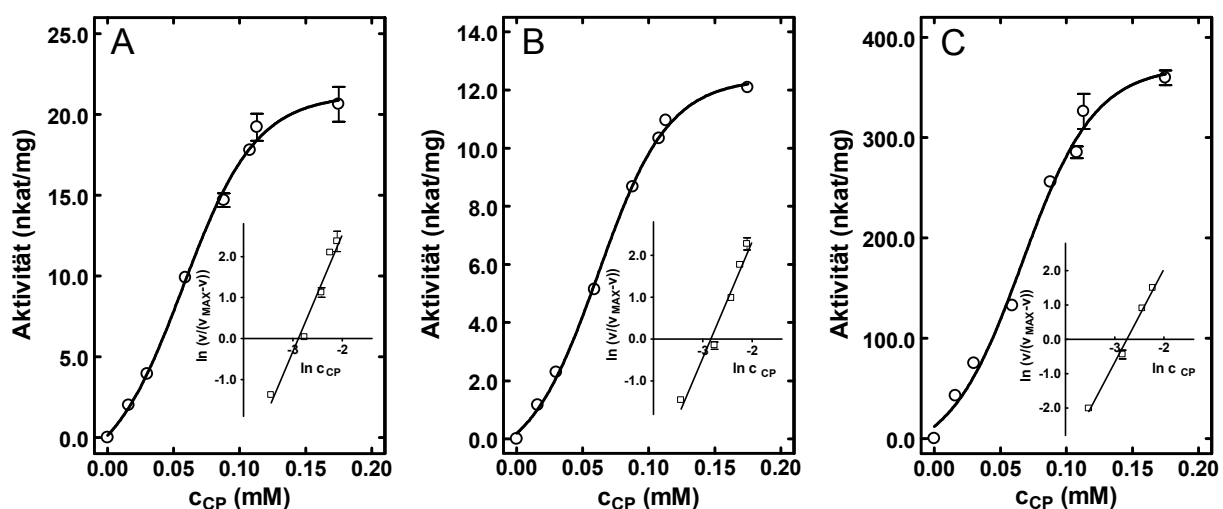


Abb. 3-25: Methyltransferase I-Aktivität in Abhängigkeit der Corrinoideprotein-Konzentration. Die Messungen wurden mit einer Vanillat- (MT I_{van} und MT I_{van} 1d87) beziehungsweise 3-Hydroxyanisol-Konzentration (MT I_{ver}) von 5 mM durchgeführt. Die Insets zeigen den Hill-Plot der Messwerte. A: MT I_{van}. B: MT I_{ver}. C: MT I_{van} 1d87. Der Reaktionsansatz enthielt 2 mM ATP; 10 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 5 mM Vanillat oder 3-Hydroxyanisol; 0,5 mM Ti(III)citrat; 10 μg AE (Rohextrakt AE_{van} 11b) und 1,5 μM MT I.

3.3.2. Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase

Auch für die Veratrol-Methyltransferase I wurde eine Strukturvorhersage durchgeführt (Abb. 3-26). Ähnlich wie bei der MT I_{van} wurde für das Enzym am C-Terminus eine TIM-Barrel-Struktur vorhergesagt (Bennett-Lovsey et al. 2008). Die ersten ca. 100 Aminosäuren umgeben als Abfolge von α -Helices diese Struktur. Da durch die Verkürzung der MT I_{van} am N-Terminus die hochaktive MT I_{van} 1d87 erzeugt wurde, die ein stark erweitertes Substratspektrum aufwies, sollte auch für die MT I_{ver} eine entsprechende Mutante erzeugt werden. Die deletierten Enzyme wurden wiederum mittels PCR durch die Kombination eines das 3'-Ende des Gens flankierenden Reverse- und eines im Gen ansetzenden Forward-Primers amplifiziert.

Für die Erzeugung einer MT I_{ver}-Mutante, die der hochaktiven Vanillat-Mutante MT I_{van} 1d87 entsprach, wurde der gleiche prozentuale Anteil von Aminosäuren (25%) vom N-Terminus der MT I_{ver} abgeschnitten. Durch die Entfernung der ersten 80 Aminosäuren wurden, gemäß der vorhergesagten Struktur der MT I_{ver} (Abb. 3-26), die ersten drei mutmaßlichen α -Helices abgeschnitten. Die Mutante 1d80 zeigte jedoch weder eine Änderung des Substratspektrums noch eine Erhöhung der Aktivität. MT I_{ver} 1d80 konnte lediglich Methylchlorid als Substrat nutzen. Keiner der eingesetzten Phenylmethylether konnte von dieser Deletionsmutante demethyliert werden (Tab. 3-11).

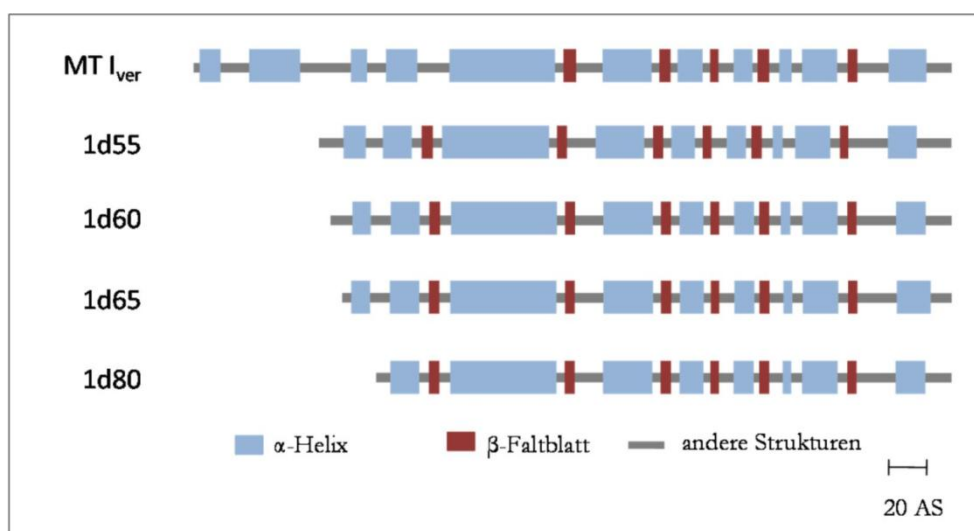


Abb. 3-26: Analyse der Sekundärstrukturen der MT I_{ver} und deren Deletionsmutanten. Die Vorhersage der Sekundärstrukturen erfolgte mittels Quickphyre (Bennett-Lovsey et al. 2008).

Durch die Erzeugung der Deletionsmutanten 1d55, 1d60 und 1d65 wurden die ersten beiden mutmaßlichen α -Helices entfernt. Zudem wurde mit diesen Mutanten schrittweise der Abstand zwischen der 2. und 3. mutmaßlichen α -Helix verkürzt, um den Einfluss dieses Bereiches der Aminosäuresequenz auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Die Deletionsmutante MT I_{ver} 1d55,

für deren Erzeugung unmittelbar nach der zweiten mutmaßlichen α -Helix geschnitten wurde (Abb. 3-26), zeigte eine deutlich gesteigerte spezifische Aktivität im Vergleich zum unmutierten Enzym (Tab. 3-11). Vor allem Vanillat und Methylchlorid konnten von MT I_{ver} 1d55 deutlich besser umgesetzt werden. Die Aktivität wurde um den Faktor 30-40 gesteigert (Tab. 3-11). Auch alle anderen Substrate, die sowohl von der Deletionsmutante 1d55 als auch vom unmutierten Enzym demethyliert werden konnten, wurden von der Mutante um den Faktor 5-20 besser umgesetzt (Tab. 3-11). Zudem konnte die Deletionsmutante 1d55 Methanol und 3,4,5-Trimethoxybenzoat umsetzen, wozu die unmutierte MT I_{ver} nicht in der Lage war (Tab. 3-11).

Tab. 3-11: Bestimmung des Substratspektrums und des Zinkgehaltes der Deletionsmutanten der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase. Strukturformeln der eingesetzten Phenylmethylether siehe Abb. 3-21. 0: spezifische Aktivität $\leq 0,01$ nkat/mg.

Substrat	spezifische Aktivität (nkat/mg)				
	MT I _{ver}	1d55	1d60	1d65	1d80
Vanillat	0,32	13,54	24,62	5,92	0
Isovanillat	2,09	31,65	31,12	5,06	0
Syringat	1,05	15,65	18,29	4,90	0
Guajakol	1,52	14,53	14,87	3,34	0
Veratrol	3,29	32,74	40,09	10,25	0
3-Hydroxyanisol	3,93	22,33	22,68	8,69	0
2-Chloranisol	1,21	26,56	29,23	4,86	0
2-Methoxybenzoat	1,69	8,26	9,32	n.b. ^b	n.b.
3,4,5-TMB ^a	0	4,92	6,33	3,03	0
Methylchlorid	0,44	15,35	27,54	8,91	0,66
Methanol	0	3,87	6,51	0,30	0
Methylamin	0	0	0	0	0
Methionin	0	0	2,11	0	0
Diethylether	0	0	3,69	0	0
Zinkgehalt (mol Zink/ mol Protein)	1,00 \pm 0,04	1,00 \pm 0,01	1,01 \pm 0,04	1,01 \pm 0,02	0,97 \pm 0,03

^a 3,4,5-Trimethoxybenzoat ^b nicht bestimmt

Durch die Entfernung der ersten 60 Aminosäuren (MT I_{ver} 1d60) wurde zwischen den beiden von der Strukturvorhersage prognostizierten α -Helices 2 und 3 geschnitten. Die so erzeugte Mutante zeigte, ebenso wie MT I_{ver} 1d55, gegenüber der unmutierten MT I_{ver} eine deutlich erhöhte Aktivität mit allen getesteten Substraten. Vor allem in Anwesenheit von Vanillat oder

Methylchlorid war die Enzymaktivität stark erhöht. Die beiden Substrate wurden von der Mutante ungefähr um den Faktor 70 besser umgesetzt (Tab. 3-11). Alle anderen Substrate wurden ungefähr 5-20-mal schneller demethyliert, was in etwa den für die Deletionsmutante 1d55 bestimmten Werten entsprach. Zusätzlich zeigte MT I_{ver} 1d60 ein verändertes Substratspektrum. Neben Methanol und 3,4,5-Trimethoxybenzoat, die auch von MT I_{ver} 1d55 umgesetzt wurden, konnte die Mutante 1d60 auch Methionin und Diethylether im Enzymtest umsetzen (Tab. 3-11).

Durch die Verkürzung des N-Terminus um 65 Aminosäuren wurden die ersten beiden mutmaßlichen α -Helices entfernt (Abb. 3-26). Die so erzeugte Mutante zeigte sowohl ein verändertes Substratspektrum als auch erhöhte spezifische Aktivitäten (Tab. 3-11). Zusätzlich zu den Substraten, die auch die unmutierte MT I_{ver} umsetzen konnte, war die Deletionsmutante in der Lage, 3,4,5-Trimethoxybenzoat und Methanol umzusetzen. Methylamin konnte hingegen, ebenso wie Methionin oder Diethylether, nicht als Substrat genutzt werden. Neben dem veränderten Substratspektrum wies MT I_{ver} 1d65 auch deutlich höhere Aktivitäten als das unmutierte Enzym auf. Der Umsatz der Substrate, die von MT I_{ver} 1d65 demethyliert werden konnten, erfolgte, mit Ausnahme von Methylchlorid und Vanillat, mit einer ca. dreifach höheren Aktivität als durch das unmutierte Enzym. Die Enzymaktivität mit Vanillat oder Methylchlorid als Substrat wurde hingegen zwanzigfach gesteigert.

Die MT I_{ver}-Deletionsmutanten sowie die unmutierte MT I_{ver} wurden im Western-Blot mittels spezifischer Antikörper gegen MT I_{ver} nachgewiesen (Abb. 3-27). Die Enzyme zeigten eine spezifische Proteinbande entsprechend ihrer apparenten molekularen Masse.

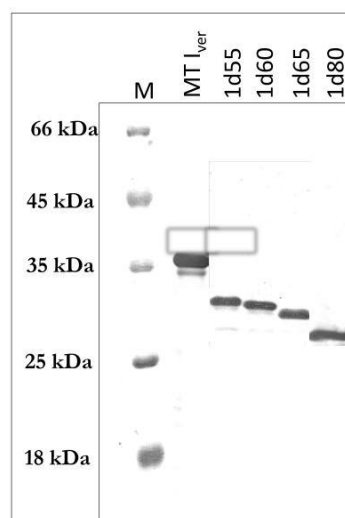


Abb. 3-27: Nachweis der Deletionsmutanten von MT I_{ver} mittels spezifischer Antikörper gegen MT I_{ver} im Western Blot. Von den gereinigten Proteinen wurden jeweils 100 ng aufgetragen.

4. Diskussion

Der anaerobe Abbau von Phenylmethylethern ist aufgrund der äußerst stabilen Etherbindung zwischen der aromatischen Ringstruktur und der Methylgruppe mechanistisch äußerst schwierig. Verschiedene acetogene Bakterien wie *Moorella thermoacetica* (Daniel et al. 1991, Kasmi et al. 1994), *Acetobacterium dehalogenans* (Traunecker et al. 1991, Kaufmann et al. 1997) oder *Holophaga foetida* (Kreft und Schink 1997) sind imstande, diese Etherbindung zu spalten und die Methylgruppe über den methylotrophen Acetyl-CoA-Weg (Abb. 1-2) zu verwerten. Schlüsselenzyme für den Abbau dieser methoxylierten Verbindungen sind dabei die O-Demethylasen. Diese Enzymsysteme bestehen aus mehreren Proteinkomponenten, die jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nur für *Acetobacterium dehalogenans* (Kaufmann et al. 1997, Kaufmann et al. 1998, Engelmann et al. 2001) und *Moorella thermoacetica* (Naidu und Ragsdale 2001) identifiziert und teilweise charakterisiert wurden.

Verschiedene methanogene Archaea wie *Methanosarcina barkeri* oder *Methanosarcina acetivorans* können einfache methylierte Verbindungen wie Methanol, Methylamin oder Methylthiol als Substrate nutzen (Sauer et al. 1997, Tallant und Krzycki 1997, Pritchett und Metcalf 2005). Die Demethylierung dieser chemisch inerten Substrate erfolgt ebenfalls über ein Methyltransferase-System, welches den für *A. dehalogenans* (Kaufmann et al. 1997, Kaufmann et al. 1998) und *Moorella thermoacetica* (Naidu und Ragsdale 2001) beschriebenen Systemen sehr ähnlich ist. Die übertragene Methylgruppe kann dabei zu Methan reduziert oder zu CO₂ oxidiert werden (van der Meijden et al. 1984). Die Übertragung der Methylgruppe auf Coenzym M, welches methyliert ein Intermediat des Energiestoffwechsels der methanogenen Archaea darstellt (Thauer 1998), wird von zwei Methyltransferasen und einem Corrinoideprotein katalysiert (Hagemeier et al. 2006). Die erste Methyltransferase überträgt, ähnlich wie bei den O-Demethylasen von *Acetobacterium dehalogenans*, die Methylgruppe vom Substrat auf das Corrinoideprotein, wohingegen die zweite Methyltransferase Coenzym M, anstelle von Tetrahydrofolat bei methylotrophen Bakterien, methyliert. Methylgruppendonator dieser Reaktion ist das methylierte Cobalamin des Corrinoideproteins. Auch für die methanogenen Systeme sind aktivierende Komponenten wie MAP (Daas et al. 1993) oder RamM (Srinivasan et al. 2002) beschrieben, die in ihrer Funktion dem Aktivierenden Enzym von *A. dehalogenans* entsprechen.

Die Anzahl von methoxylierten Verbindungen, die *Acetobacterium dehalogenans* als Wachstumssubstrat nutzen kann, ist im Vergleich zu anderen acetogenen Vertretern wie *Moorella thermoacetica* oder *Clostridium methoxybenzovorans* deutlich eingeschränkt. Während *A. dehalogenans* lediglich bei drei der eingesetzten Phenylmethylether die Demethylierung mit Wachstum koppeln

kann (Traunecker et al. 1991, Engelmann et al. 2001), können sowohl *M. thermoacetica* (Daniel et al. 1991) als auch *C. methoxybenzovorans* (Mechichi et al. 1999) mehr als 20 verschiedene methoxylierte Aromaten als Wachstumssubstrate nutzen. Die Methyltransferasen I von *A. dehalogenans*, vor allem die MT I_{ver}, können jedoch eine wesentlich größere Anzahl von Phenylmethylethern demethylieren, als es die geringe Anzahl von Wachstumssubstraten vermuten lässt. Möglicherweise liegt das eingeschränkte Substratspektrum von *A. dehalogenans* darin begründet, das geeignete Transportsysteme für die Aufnahme dieser Phenylmethylether in die Zelle fehlen. *A. dehalogenans* kann möglicherweise nur Vanillat, Syringat und 3-Hydroxyanisol (Kaufmann et al. 1997, Engelmann et al. 2001) in die Zelle aufnehmen und damit als Wachstumssubstrat nutzen.

Auch *Holophaga foetida* kann in Zellextrakten eine weitaus größere Anzahl an methoxylierten Aromaten demethylieren, als es zum Wachstum nutzt (Kreft und Schink 1997). Zudem exprimiert dieses acetogene Bakterium, ähnlich wie *A. dehalogenans*, in Abhängigkeit des Wachstumssubstrates zwei verschiedene O-Demethylase-Systeme (Kreft und Schink 1997). *Holophaga foetida*-Zellen, die auf 3,5-Dihydroxyanisol kultiviert wurden, konnten nur Substrate demethylieren, die in der Meta-Position zur Methoxygruppe eine Hydroxygruppe aufwiesen (Kreft und Schink 1997). Kulturen, die 3,4,5-Trimethoxybenzoat als Wachstumssubstrat verwerteten, zeigten hingegen ein wesentlich breiteres Substratspektrum (Kreft und Schink 1997). Auch die beiden untersuchten Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* wiesen deutlich unterschiedliche Substratspektren auf. Die Vanillat-Methyltransferase I (MT I_{van}) konnte von den getesteten methoxylierten Substraten nur die Phenylmethylether demethylieren, die in ortho-Position zur Methoxygruppe eine Hydroxygruppe aufwiesen. Die Veratrol-Methyltransferase I (MT I_{ver}) hingegen zeigte eine solche Abhängigkeit nicht. Die von MT I_{ver} umgesetzten Substrate zeigten keine einheitlichen strukturellen Eigenschaften. Zudem konnten auch nichtaromatische Verbindungen wie Methylchlorid von MT I_{ver} demethyliert werden. Ähnlich wie bei den beiden O-Demethylase-Systemen von *Holophaga foetida* überschneiden sich auch die Substratspektren der beiden charakterisierten Methyltransferasen I. MT I_{ver} ist in der Lage, alle Substrate der MT I_{van} zu demethylieren, jedoch mit deutlich geringeren spezifischen Aktivitäten.

Die Enzymaktivitäten der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, waren deutlich höher als die Aktivitäten der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase, die in früheren Arbeiten bestimmt wurden (Kaufmann et al. 1998, Engelmann et al. 2001). Die Bestimmung der Enzymaktivitäten der O-Demethylasen erfolgte dabei sowohl bei Kaufmann et al. (1998) als auch bei Engelmann et al. (2001) mittels eines gekoppelten optischen Tests, wobei neben den vier Komponenten der O-Demethylase noch drei

zusätzliche Enzyme, die Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, die Methylen-Tetrahydrofolat-Dehydrogenase und die Lactat-Dehydrogenase eingesetzt wurden (Meßmer et al. 1996). Die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymaktivität der O-Demethylase wird also in diesem sehr komplexen Aktivitätstest neben den Aktivitäten der Methyltransferase I, der Methyltransferase II und dem Aktivierenden Enzym durch drei weitere Enzyme beeinflusst. Dies hat möglicherweise eine geringere Gesamtaktivität der O-Demethylase zur Folge. Die Bestimmung der Aktivitäten der Methyltransferasen I in der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Hilfe eines anderen photometrischen Tests anhand der Methylierung des Cobalamin-Kofaktors des Corrinoide-Proteins. Die Messung der MT I-Aktivitäten über die Bildung von Methylcobalamin war wesentlich sensitiver und auch weniger störanfällig als der für die Bestimmung der O-Demethylase-Aktivität verwendete gekoppelte optische Test (Meßmer et al. 1996), da neben dem Substrat, ATP, Titan(III)citrat und DTT, nur MT I, CP und das Aktivierende Enzym für die Aktivitätsmessung benötigt wurden. Somit ist eine deutlich einfachere Bestimmung der Enzymaktivität möglich.

Für die Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase wurde in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des vereinfachten photometrischen Tests nur für Vanillat, Isovanillat, Guajakol und Syringat eine enzymatische Aktivität bestimmt. Die Demethylierung von Veratrol, 3-Hydroxyanisol und 2-Chloranisol, die laut Engelmann et al. (2001) mit geringer Aktivität von der Vanillat-O-Demethylase umgesetzt wurden, konnte für die gereinigte Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase nicht bestätigt werden. Dies widersprach der erwarteten Übereinstimmung der beiden Substratspektren. Die Methyltransferase I-Reaktion ist mit der Übertragung der Methylgruppe vom methoxylierten Substrat auf das Corrinoideprotein die eigentliche substratspezifische Reaktion. Die weitere Umsetzung der Methylgruppe im methylo trophen Stoffwechsel ist unabhängig vom methylgruppenliefernden Phenylmethylether. Ein unterschiedliches Substratspektrum der O-Demethylasen sollte daher allein auf die Methyltransferase I zurückzuführen sein, da sie die Substratspezifität des gesamten Enzym-Komplexes vermittelt (Schilhabel, Studenik et al. 2009). Die von Engelmann et al. (2001) durchgeführten Messungen erfolgten mit Rohextrakten von *A. debalogenans*. In einer anderen Arbeit (Lange 2009) wurde gezeigt, dass sich die Substratspektren der Methyltransferasen I, deren Aktivität im Rohextrakt von *A. debalogenans* gemessen wurden, von den Substratspezifitäten der gereinigten Methyltransferasen I deutlich unterscheiden. Für *Desulfotobacterium hafniense* DCB2 wurde die Fähigkeit zur O-Demethylierung von Phenylmethylethern und der methylo trophen Verwertung der Methylgruppe zu Acetat nachgewiesen (Neumann et al. 2004, Kreher et al. 2008). Im Genom dieses vollständig sequenzierten Bakteriums wurden 15 Operons, die große

Ähnlichkeit mit den O-Demethylasen von *A. dehalogenans* aufweisen, identifiziert. Durch „Genome Walking“ wurde in der Nähe des Aktivierenden Enzyms ein drittes O-Demethylase-Operon nachgewiesen (Schilhabel, Studenik et al. 2009), so dass für *A. dehalogenans* ebenfalls, vergleichbar mit *D. hafniense* DCB2, eine große Anzahl verschiedener O-Demethylasen vermutet wird. Das Substratspektrum der Vanillat-O-Demethylase wurde in einer anderen Arbeit auch mit den gereinigten Einzelkomponenten (Kaufmann et al. 1998) untersucht. In diesem Fall wurden nur Vanillat, Isovanillat, Syringat und Guajakol demethyliert. Dies entspricht dem in der vorliegenden Arbeit bestimmten Substratspektrum der Methyltransferase I. Das abweichende Substratspektrum der Vanillat-O-Demethylase im Rohextrakt (Engelmann et al. 2001) von den in dieser Arbeit bestimmten Substratspektren der Methyltransferase I ist daher nach jetzigen Erkenntnisstand höchstwahrscheinlich mit der Anwesenheit einer zusätzlichen O-Demethylase zu erklären, die entweder konstitutiv exprimiert oder durch das jeweilige Wachstumssubstrat induziert wird. Die für die Veratrol-O-Demethylase ermittelten Werte (Engelmann et al. 2001) weichen ebenfalls von dem in dieser Arbeit bestimmten Substratspektrum der MT I_{ver} ab (Tab. 3-1). Die deutlich bessere Umsetzung von 2-Chloranisol durch die Veratrol-O-Demethylase (Engelmann et al. 2001) im Vergleich zur gereinigten Methyltransferase I kann auch hier auf die Verwendung von Rohextrakten für die Messung zurückgeführt werden, die möglicherweise zusätzliche MT I-Aktivitäten aufwiesen.

Metalle sind häufig als Kofaktoren in den aktiven Zentren von Enzymen lokalisiert. Sie sind entweder direkt an der Katalyse beteiligt oder beeinflussen durch eine aktivierende oder stabilisierende Wirkung die Reaktion (Karlin 1993). Neben Zink (Vallee und Auld 1990 a) sind unter anderem auch Eisen, Cobalt, Nickel, Kupfer, Mangan oder Molybdän (Ermler et al. 1998) als Kofaktoren von Enzymen beschrieben. Alkyltransferasen, die wie die beiden Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* die Übertragung von Methylgruppen katalysieren, wurden als zinkhaltige Enzyme beschrieben. Zu ihnen zählen die Methanol-Cobalamin-Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* (Sauer und Thauer 1997) sowie die Methioninsynthasen von *Escherichia coli* (González et al. 1996, Goulding und Matthews 1997). Für die Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* wurde ein Zinkgehalt von ungefähr 1 mol Zink pro mol Enzym bestimmt. Die Enzymaktivität beider Methyltransferasen I wurde durch den Zusatz von Zink, und in geringerem Maß auch durch die Zugabe von Magnesium, gesteigert. Die Inkubation mit anderen zweiwertigen Metallen hatte hingegen keinen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität. Für die Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri*, die eine ähnliche Enzymreaktion wie die Methyltransferase I von *A. dehalogenans* katalysiert, wurde ebenfalls eine Erhöhung der Enzymaktivität durch den Zusatz von Zink und Magnesium nachgewiesen (van

der Meijden et al. 1984, Sauer und Thauer 1997). Magnesium hatte zudem eine stabilisierende Wirkung auf MtaB (van der Meijden et al. 1984). Auch für die Cobalamin-unabhängige Methioninsynthese von *Escherichia coli* wurde für zweiwertige Metallionen (Magnesium, Mangan) eine aktivitätssteigernde Wirkung nachgewiesen (González et al. 1996). Zueiwertige Metallionen können durch Metallchelatoren wie EDTA gebunden und somit der Reaktion entzogen werden (Carver et al. 1984). Enzymgebundene Metalle werden durch EDTA ebenfalls komplexiert und können damit eine mögliche katalytische Rolle im Enzym nicht mehr erfüllen. Der Metallgehalt des Enzyms wird durch die EDTA-Behandlung nicht beeinflusst, da das EDTA die enzymgebundenen Metalle nur komplexiert jedoch nicht aus dem Protein löst (siehe auch LeClerc und Grahame 1996). Der Zusatz von 1 mM EDTA zum Reaktionsansatz der Aktivitätsmessung der nativen und rekombinanten Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase führte zu einem Verlust der Enzymaktivität. Durch eine Abtrennung des EDTA's mittels Gelfiltration beziehungsweise durch den Zusatz von 1 mM Zink wurde die Ausgangsaktivität wiederhergestellt. Eine weitere Erhöhung der Zinkkonzentration führte wiederum zu einer Aktivitätssteigerung beider Methyltransferasen I. Sowohl für die Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* (Sauer und Thauer 1997) als auch für die Methylcobamid-Coenzym M Methyltransferase MT 2 (LeClerc und Grahame 1996) des gleichen Organismus, beides zinkhaltige Enzyme, wurde eine vergleichbare reversible Wirkung von EDTA nachgewiesen. Für die Cobalamin-unabhängige Methioninsynthese von *Escherichia coli* (González et al. 1996) wurde ebenfalls die Inaktivierung des Enzyms durch EDTA und die Reaktivierung der Enzymaktivität durch den Zusatz von Zink gezeigt. Für alle drei Enzyme wurde damit eine essentielle Bedeutung des Metalls im Enzym nachgewiesen (González et al. 1996, LeClerc und Grahame 1996, Sauer und Thauer 1997). Das enzymgebundene Zink der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase von *A. debalogenans* scheint für die Funktion der Enzyme ebenfalls essentiell zu sein und übernimmt daher höchstwahrscheinlich eine katalytische Rolle während der Demethylierung der Phenylmethylether und der Übertragung der Methylgruppe auf das Corrinoidprotein.

Bei katalytisch aktivem Zink erfolgt die Bindung im Protein über die Seitenketten von drei Aminosäuren, wobei es sich um Histidin, Cystein, Glutamat oder Aspartat handeln kann. Als vierter Ligand fungiert ein Wassermolekül (Vallee und Auld 1990 b). Für die Zinkbindung in Enzymen gibt es kein streng konserviertes Bindemotiv. Bei Enzymen, in denen Zink an der Katalyse beteiligt ist, sind jedoch meist zwei Bindepertner nur durch einen kurzen Abstand von 1- 3 Aminosäuren getrennt; die Distanz zur dritten zinkbindenden Aminosäure ist deutlich größer (20- 120 Aminosäuren, Vallee und Auld 1990 b). Für die Methyltransferasen I der

Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase wurden Punktmutanten erzeugt, bei denen zur Zinkbindung befähigte Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht wurden, um deren Einfluss auf die Zinkbindung zu untersuchen. Der Austausch eines Liganden des Zinkbindemotivs gegen Alanin führt bereits zum Verlust des enzymgebundenen Zinks und zu einem inaktiven Enzym (Goulding und Matthews 1997). Der Austausch der Aminosäuren Aspartat 83, Cystein 111 oder Cystein 151 der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase gegen Alanin resultierte jeweils in inaktiven Enzymen, die kein Zink mehr gebunden hatten. Diese drei Aminosäuren wurden daher als Zink-Liganden identifiziert. Der Austausch der anderen sechs Cysteinreste, die in der Sequenz von MT I_{ver} enthalten sind, führte zwar teilweise zu veränderten Substratspektren, die Enzyme waren aber alle noch aktiv und die Zinkbindung wurde durch die Mutation nicht beeinflusst. Der Verlust der Fähigkeit zur Zinkbindung beruht also nicht auf dem Austausch von beliebigen Cysteinresten, die möglicherweise durch Disulfidbrücken die Proteinstruktur bedingen, sondern auf den spezifischen Austausch der Cysteine an Position 111 und 151. Bei der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase erzeugte der Austausch der Glutamate 132 und 147 sowie des Histidins 168 Enzyme, die keine Zinkbindung mehr aufwiesen. Daher wurden E132, E147 und H168 als zinkbindende Aminosäuren des Zinkbindemotivs der Vanillat-Methyltransferase I identifiziert. Die Bindemotive der beiden Methyltransferasen I unterscheiden sich damit deutlich voneinander. Während die Bindung des Zinks in MT I_{ver} über die Schwefelatome der Cysteine und ein Sauerstoffatom der Carboxylgruppe des Aspartats erfolgt, wird das Zink in MT I_{van} über zwei Sauerstoffatome der Carboxylgruppen der Glutamate und über ein Stickstoff des Imidazolrings des Histidins gebunden. Auch die Distanzen zwischen den Zinkliganden unterscheiden sich bei den beiden Methyltransferasen. Die zinkbindenden Aminosäuren liegen bei MT I_{van} näher beieinander. Die Abstände betragen 15 (zwischen E132 und E147) beziehungsweise 21 (zwischen E147 und H168) Aminosäuren. Die Distanzen zwischen den Zinkliganden von MT I_{ver} sind im Vergleich zum Bindemotiv von MT I_{van} ungefähr doppelt so groß und betragen 28 (zwischen D83 und C111) und 40 (zwischen C111 und C151) Aminosäuren. Bei beiden Enzymen wurde daher das als konserviert beschriebene Bindemotiv mit einem kurzen und einem längeren Abstand zwischen den zinkbindenden Aminosäuren (Vallee und Auld 1990 b) nicht nachgewiesen. Die Zinkbindemotive von MT I_{ver} und MT I_{van} unterscheiden sich damit auch stark von anderen publizierten Motiven wie den Zinkbindemotiven der Methioninsynthasen von *E. coli* (Peariso et al. 1998, Zhou et al. 1999). Die einzige Ausnahme bildet das Bindemotiv von MtaB von *Methanosarcina barkeri*, welches als neuartig beschrieben wurde (Hagemeier et al. 2006). Dieses für Zinkenzyme ungewöhnliche Bindemotiv zeichnet sich durch nahezu gleiche Abstände der drei Liganden zueinander aus. Die Distanz zwischen ersten und zweiten Bindepertner beträgt 56 Aminosäuren, der dritte Ligand ist

durch 49 Aminosäuren vom zweiten Zinkbindepartner getrennt (Hagemeier et al. 2006). Der ungewöhnlich große Abstand zwischen allen drei Zinkliganden ist jedoch die einzige Übereinstimmung des Bindemotivs von MtaB mit den beiden Bindemotiven von MT I_{van} und MT I_{ver}. Bezüglich der Distanzen zwischen den Bindepartnern und den Aminosäuren, welche die Zinkbindung vermitteln, unterscheiden sich die beiden Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* auch von dem für die Methanol-Methyltransferase MtaB bestimmten Bindemotiv E-X₅₆-C-X₄₉-C (Hagemeier et al. 2006). Die Methanol-Cobamid-Methyltransferase MtaB von *M. barkeri* katalysiert in einer vergleichbaren Reaktion wie die Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* die Spaltung einer C-O-Bindung und die Übertragung der Methylgruppe auf ein Corrinoideprotein. Trotz der Abweichungen hinsichtlich der zinkbindenden Aminosäuren und deren Distanzen zueinander, gleichen die Bindemotive der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase eher dem Bindemotiv der funktionell ähnlichen archealen Methyltransferase MtaB, als den Zinkbindemotiven anderer bakterieller, phylogenetisch näher verwandter Enzyme wie den zinkhaltigen Methioninsynthasen von *E. coli* (Peariso et al. 1998, Zhou et al. 1999).

Für die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase sind bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Kristallstrukturen verfügbar, so dass nur anhand von Strukturvergleichen Aussagen über die Sekundärstruktur der beiden Enzyme gemacht werden konnten. Computerbasierende Strukturanalysen mittels Quickphyre (Bennett-Lovsey et al. 2008) prognostizierten für beide Methyltransferasen I eine TIM-Barrel Struktur. Der N-terminale Bereich der Sekundärstruktur der Methyltransferasen I, also ungefähr die ersten 100-120 Aminosäuren, ist wahrscheinlich nicht Teil dieser Struktur, sondern umgibt, gemäß der Strukturvorhersage, in Form mehrerer α -Helices die TIM-Barrel-Struktur. Die TIM-Barrel-Struktur ist eine der häufigsten Strukturen von Proteinen (Wierenga 2001). Sie besteht im Allgemeinen aus einer Abfolge von 8 α -Helices und 8 β -Faltblättern, die eine tonnenartige Konformation (Barrel) einnehmen, welche namensgebend für die Struktur ist (Kobayashi et al. 1997). Bei dieser Proteinstruktur, die zum ersten Mal bei der Triosephosphat-Isomerase (TIM) beschrieben wurde, sind die β -Faltblätter, die zu einem hydrophoben Kern angeordnet sind, nach außen von den α -Helices umgeben (Kobayashi et al. 1997). Die TIM-Barrel Struktur wird von etwa 200-250 Aminosäuren gebildet (Wierenga 2001) und befindet sich bei den Methyltransferasen I von *A. dehalogenans* laut der Strukturprognose am C-Terminus der Enzyme. Die Zinkbindemotive der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase sind am N-Terminus der TIM-Barrel-Struktur lokalisiert (Abb. 4-1), womit sie sich ebenfalls von den Bindemotiven anderer Alkyltransferasen unterscheiden. Das Zinkbindemotiv von MtaB von *M. barkeri* ist am C-Terminus des TIM-Barrels lokalisiert. Nachfolgend schließen sich mehrere

Helices an, die die Struktur umgeben (Hagemeier et al. 2006). Die Bindemotive der beiden Methioninsynthesen von *E. coli*, welche dem klassischen Zinkbindemotiv entsprechen (Peariso et al. 1998, Zhou et al. 1999), befinden sich bei beiden Enzymen im C-terminalen Bereich der Proteine (Abb. 4-1). Die beiden Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase von *A. dehalogenans* zeigten auch bei der Lokalisation des Bindemotivs in der Sekundärstruktur Unterschiede (Abb. 4-1). Während die Zinkliganden der MT I_{ver} eher am N-Terminus des Proteins lokalisiert und auf verschiedene Helices verteilt sind, ist das Bindemotiv von MT I_{van} in Richtung des C-Terminus verschoben. Die Bindepertner liegen bei der MT I_{van} laut der Strukturvorhersage auf einer Helix.

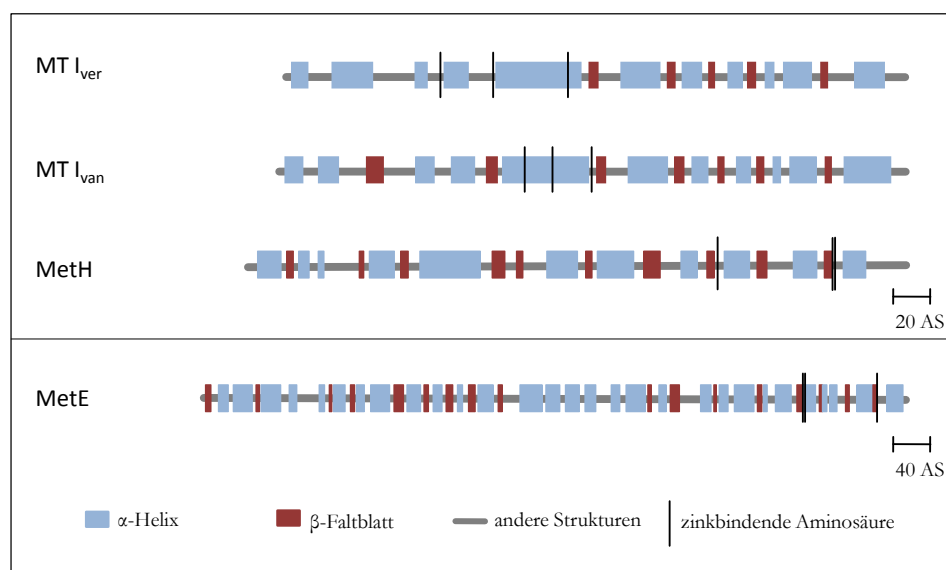


Abb. 4-1: Strukturanalyse zinkhaltiger Alkyltransferasen. Sekundärstrukturvorhersagen und identifizierte Zinkbindepertner für die MT I der Vanillat-*O*-Demethylase (MT I_{van}), die MT I der Veratrol-*O*-Demethylase (MT I_{ver}), die Cobalamin-abhängige Methioninsynthese von *E. coli* (Meth, Aminosäuren 1-353, Johnson et al. 2007) und die Cobalamin-unabhängige Methioninsynthese von *E. coli* (MetE, Johnson et al. 2007). Die Strukturvorhersagen erfolgten unter Nutzung des Quickphyre-Programms (Bennett-Lovsey et al. 2008).

Die Zinkbindung in MT I_{ver} wird durch zwei Schwefelatome (Cystein 111 und 151) und einem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von Aspartat 83 vermittelt. Die Bedeutung der genauen Position und Identität des jeweiligen Zinkbindepertners wurde mit einer Reihe von Kontrollmutanten untersucht, wobei exemplarisch C151 gewählt wurde. Dieser Ligand wird direkt von zwei Aminosäuren, D150 und H152, flankiert, die ebenfalls die Zinkbindung vermitteln können. Der Austausch dieser flankierenden Aminosäuren gegen Alanin beeinflusste die Zinkbindung nicht, jedoch wurde die Aktivität deutlich herabgesetzt. Für die MT I_{van} wurde ein ähnlicher Zusammenhang gezeigt. Die Mutation von E133, H146 und H166, die ebenfalls

Zink binden könnten und die zinkbindenden Aminosäuren flankieren, hatte keinen Einfluss auf die Zinkbindung. Die Bindung von Zink an einer der drei Positionen des Bindemotivs wird daher nur durch einen einzelnen Liganden und nicht durch einen Cluster mehrerer zur Zinkbindung befähigter Aminosäuren vermittelt. Das Cystein 151 der MT I_{ver} wurde zudem gegen Aspartat, welches an der Position 83 der Aminosäuresequenz von MT I_{ver} an der Zinkbindung beteiligt ist, ausgetauscht, um die Bedeutung der Aminosäure, die Zinkbindung vermittelt, zu untersuchen. Der Sauerstoff der Carboxylgruppe des Aspartats konnte an dieser Position nicht die Rolle des Schwefels von Cystein übernehmen. Das Enzym war inaktiv und wies kein Zink mehr auf. Die Zinkbindung an einer Position erfolgt also nur durch eine ganz spezifische Aminosäure. Ein Austausch gegen eine andere Aminosäure, die potentiell auch in der Lage wäre Zink zu binden, kann die Funktion des spezifischen Liganden nicht erfüllen. Als zusätzliche Kontrolle wurden jeweils durch eine Doppelmutation die direkt benachbarten Aminosäuren D150 oder H152 gegen Cystein und das Cystein 151 im gleichen Schritt gegen Alanin ausgetauscht. In beiden Fällen wurde im inaktiven Enzym kein gebundenes Zink nachgewiesen, wodurch gezeigt wurde, dass auch die Position des Zinkliganden genau definiert ist. Die Verschiebung des Zinkliganden um nur eine Position führt bereits zum Verlust der Fähigkeit der Zinkbindung. Die Zinkbindung ist also von der genauen Position einer ganz spezifischen Aminosäure abhängig. Der Austausch gegen eine andere zinkbindende Aminosäure oder die geringfügige Verschiebung des Liganden resultiert bereits im Verlust der Fähigkeit zur Zinkbindung. Ein ähnlicher Zusammenhang ist auch für das Ada Protein von *Escherichia coli* beschrieben. Dieses Protein, welches einerseits eine wichtige Rolle als Transkriptionsaktivator ausübt und andererseits als DNA-Reparaturenzym O⁶-Methylguanin und methylierte Phosphotriester demethylieren kann (Sedgwick et al. 1988), weist mit Cystein 69 und Cystein 321 zwei Aminosäurereste auf, die im Zuge der Methyltransferase-Aktivität methyliert werden. Cystein 69 fungiert dabei bei der Demethylierung der methylierten Phosphotriester und Cystein 321 bei der Demethylierung von O⁶-Methylguanin als Methylgruppenakzeptor (Tano et al. 1989). Direkt benachbart, an Position 322, ist in diesem Enzym ein Histidin lokalisiert, welches möglicherweise die Funktion des Cysteins übernehmen könnte (Tano et al. 1989). Sowohl der Austausch des Cysteins 321 gegen Histidin als auch die Doppelmutation von Cys 321-His 322 zu His 321-Cys 322 führte jeweils zu inaktiven Enzymen (Tano et al. 1989). Auch bei diesem Enzym sind offenbar die Position und die Spezifität der Aminosäure, die die Bindung vermittelt, genau festgelegt. Sie kann nicht gegen eine andere Aminosäure getauscht werden. Auch die Position des Liganden ist nicht variabel (Tano et al. 1989).

Die Funktionsfähigkeit und Aktivität eines Enzyms wird neben den direkten Liganden, die im Protein Metall-Kofaktoren binden, durch eine Reihe weiterer Aminosäuren bestimmt, die in der Tertiärstruktur in einer zweiten Ebene nahe dem zentralen Metallion koordiniert sind (Karlin et al. 1997). Abhängig von dem jeweiligen Metallion werden unterschiedliche Aminosäurecluster in dieser zweiten Ebene gebunden. Während Kupfer meist in der zweiten Ebene von polaren Aminosäuren umgeben ist, zeichnen sich eisenhaltige Enzyme durch eine Umgebung aus, die entweder von Histidin-Tyrosin-Clustern oder durch eine Vielzahl von Histidinen und sauren Aminosäuren charakterisiert ist (Karlin et al. 1997). Mit Zink als zentralem Metallion besteht die zweite Koordinationsebene aus geladenen Aminosäure-Seitenketten, welche hauptsächlich einen polaren Charakter haben (Karlin und Zhu 1997). Diese geladenen Seitenketten, die über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Zinkliganden verbunden sind, unterstützen die Reaktionsfähigkeit des Zinks und können somit die Aktivität des Enzyms beeinflussen (Christianson und Cox 1999). Die Umgebung der zinkbindenden Aminosäuren von MT I_{van} und MT I_{ver} weist eine Vielzahl dieser geladenen polaren Aminosäuren wie Glutamat, Aspartat, Lysin, Arginin oder Histidin auf, wobei die negativ geladenen Aminosäuren überwiegen (Abb. 3-13 und 3-16). Der Austausch der Aminosäuren, die das mutmaßliche Zinkbindemotiv der beiden Methyltransferasen I in einer zweiten Ebene umgeben, resultierte in Enzymen, deren Aktivität reduziert (Abb. 4-2) und deren Substratspektrum teilweise eingeschränkt war. Strukturvorhersagen dieser einzelnen Mutanten zeigten keinerlei Veränderung der Sekundärstruktur, so dass die verringerte Aktivität wahrscheinlich nicht auf Änderungen in der

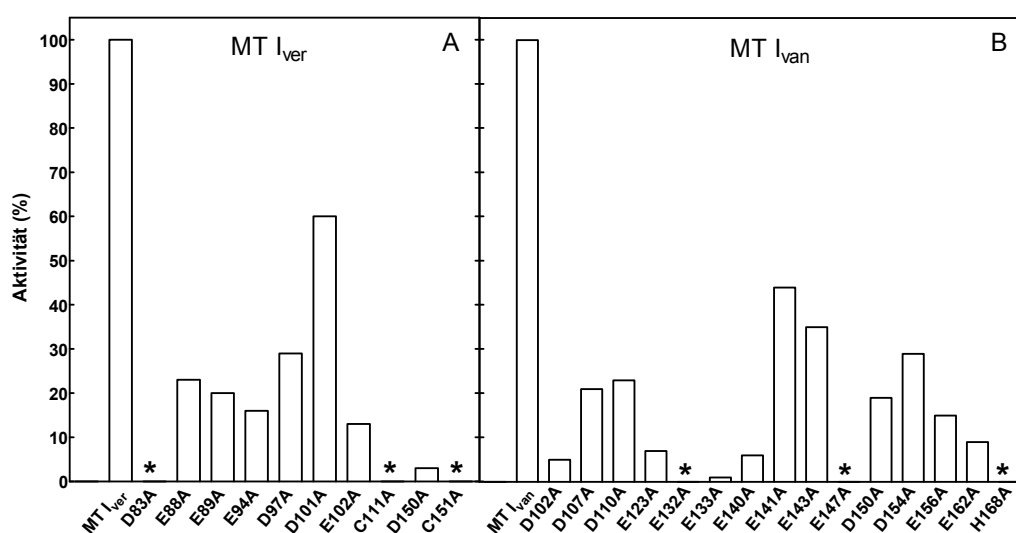


Abb. 4-2: Aktivitäten der Punktmutanten der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase. Die Enzymaktivität der unmutierten Methyltransferase I betrug 100%. A: MT I_{ver} und die betreffenden Punktmutanten. B: MT I_{van} und die entsprechenden Mutanten.

Enzymstruktur beruht. Diese Aminosäuren beeinflussen durch ihren polaren Charakter eher die katalysierte Reaktion oder die Reaktionsfähigkeit des Kofaktors. Zink mit einer katalytischen Funktion erleichtert die Spaltung sehr stabiler Verbindungen wie Methanol oder der Etherbindungen, indem das als vierter Ligand gebundene Wasser aktiviert wird, welches anschließend eine erleichterte Katalyse ermöglicht (Parkin 2004). Die eigentliche Spaltung einer chemisch so stabilen Verbindung wird durch die Kombination des stark nukleophilen Cobalamins und der stark elektrophilen Wirkung des Zinks ermöglicht (Hagemeier et al. 2006). Die Reaktion erfolgt wahrscheinlich über einen ähnlichen Mechanismus wie er für die Methanol-Cobalamin Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* beschrieben ist. Bei MtaB wird Methanol im aktiven Zentrum so ausgerichtet, dass die Methylgruppe in Richtung des nukleophilen Cobalamins und die Hydroxylgruppe in Richtung des elektrophilen Zinks zeigt (Hagemeier et al. 2006). Durch die damit erzielte Polarisierung der Verbindung wird eine Spaltung und Übertragung der Methylgruppe auf den Cobalamin-Kofaktor des Corrinoid-Proteins ermöglicht, wobei die elektronenziehende Wirkung des Zinks durch die negativ geladenen Aminosäuren der zweiten Koordinationsebene unterstützt wird (Hagemeier et al. 2006). Die Etherbindung des Phenylmethylethers ist chemisch noch schwerer angreifbar, da das an den Aromaten gebundene Sauerstoffatom der Etherbindung nur durch ein sehr starkes Elektrophil angegriffen werden kann. Daher wird möglicherweise eine starke dielektrische Umgebung des aktiven Zentrums benötigt, um die Etherbindung zu polarisieren und die Methylgruppe zu übertragen. Diese stark negativ geladene Umgebung wird wahrscheinlich durch die negativen Seitenketten der Glutamate und Aspartate geschaffen, so dass der Austausch der einzelnen Aminosäuren gegen das unpolare Alanin eine Abschwächung des elektrophilen Charakters und damit eine schlechtere Umsetzung der chemisch inerten Verbindungen nach sich zieht. Die durch den Austausch der polaren Aminosäuren unbeeinflusste Methylchlorid-Umsetzung könnte dieses Modell unterstützen, da die C-Cl-Bindung stärker polarisiert ist als die C-O-Bindung und daher leichter angreifbar ist. Somit wird bei der Umsetzung von Methylchlorid eventuell keine starke elektrophile Umgebung benötigt, so dass der Austausch der sauren Seitenketten keinen Effekt auf die Aktivität hat. Die unterschiedlich starke Beeinflussung der Aktivität bei den unterschiedlichen Mutanten könnte davon abhängig sein, wie sie im aktiven Zentrum positioniert sind und wie gravierend ein Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure an dieser Stelle ist. Dies kann jedoch nur anhand der Kristallstruktur des Proteins geklärt werden, die bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorliegt.

Die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase von *A. debalogenans* katalysieren die Spaltung der Etherbindung im methoxylierten Substrat und die Übertragung der

Methylgruppe auf das Corrinoidprotein. Trotz ihrer identischen Funktion unterscheiden sich die Methyltransferasen I in ihrer Aminosäuresequenz deutlich voneinander. Die mittels des Strukturvorhersage-Programms Quickphyre (Bennett-Lovsey et al. 2008) prognostizierten Sekundärstrukturen der beiden Enzyme zeigen einen stark variablen N-Terminus, der sich bei den beiden Methyltransferasen I deutlich unterscheidet (Abb. 4-3). Der C-Terminus, welcher die

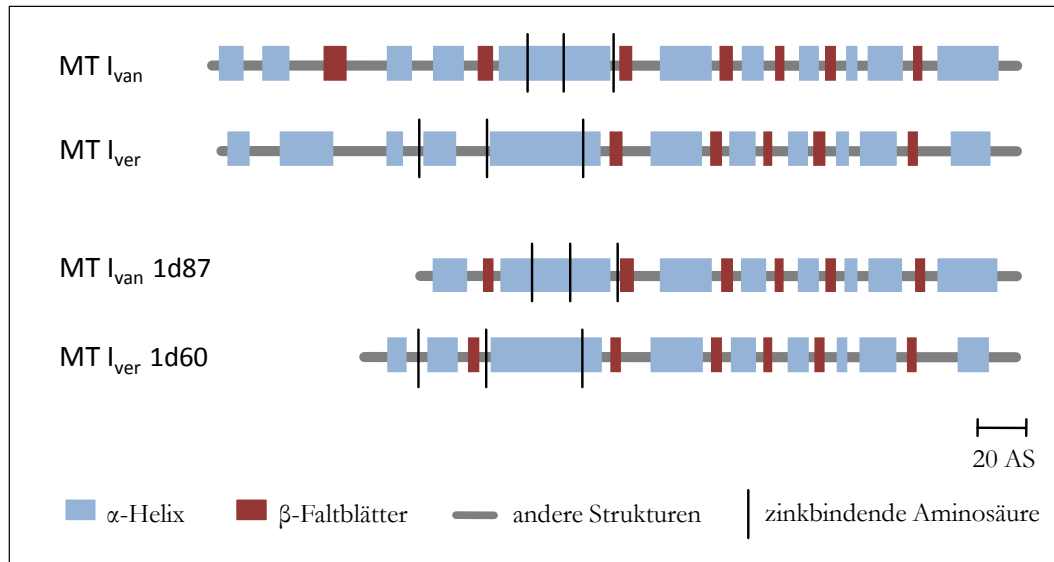


Abb. 4-3: Strukturvergleich der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase. Analyse der Sekundärstrukturen der Vanillat Methyltransferase I (MT I_{van}), der Veratrol Methyltransferase I (MT I_{ver}), sowie der entsprechenden Deletionsmutanten MT I_{van} 1d87 und MT I_{ver} 1d60.

TIM-Barrel-Struktur bildet, ist jedoch bei beiden Enzymen gleich. Da sich die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase in ihren Substratspektren stark voneinander unterscheiden, bestand die Vermutung, dass der variable N-Terminus möglicherweise für die Substratspezifität verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden beiden Methyltransferasen I an ihrem N-Terminus verkürzt. Bei der Entfernung der ersten 87 Aminosäuren vom N-Terminus der MT I_{van}, was ungefähr 25% der gesamten Aminosäuresequenz entspricht, blieb die Enzymaktivität erhalten. Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde zudem um den Faktor 20 gesteigert. Auch bei der Methyltransferase I der Veratrol-O-Demethylase konnte der N-Terminus deutlich verkürzt werden, ohne dass die Aktivität des Enzyms reduziert wurde. Durch die Entfernung von 60 Aminosäuren, was etwa 20% der Proteingröße entspricht, wurde auch für MT I_{ver} eine Mutante erzeugt, deren Aktivität um den Faktor von 10 gesteigert wurde. Ein solches Ergebnis wurde nicht erwartet, da die Entfernung von 20% der Aminosäuren eines Proteins in der Regel zum Aktivitätsverlust führen sollte (Li et al. 1995). Vergleichbare

Untersuchungen bei Enzymen mit einer ähnlichen Funktion wie der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben. Einzig für die *Eco*RII DNA-Methyltransferase wurden N-terminale Deletionsmutanten erzeugt, um den Einfluss dieses Enzymbereichs auf die Aktivität des Enzyms zu untersuchen. Die *Eco*RII DNA-Methyltransferase katalysiert in *E. coli* die Methylierung von DNA, also die Übertragung der Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Cytosin. Die Entfernung der ersten 85 Aminosäuren am N-Terminus, was ungefähr 20% der Proteingröße entsprach, hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Eine weitere Verkürzung der DNA-Methyltransferase von *E. coli* führte zu einer Abnahme der Aktivität. Die *Eco*RII DNA-Methyltransferase wurde durch die Entfernung von mehr als 97 Aminosäuren vom N-Terminus in ihrer Aktivität vollständig inhibiert (Friedman et al. 1991). Eine Steigerung der Enzymaktivität durch die N-terminale Verkürzung des Enzyms um den Faktor 10-20, wie sie in der vorliegenden Arbeit für die Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase gezeigt wurde, erfolgte bei der *Eco*RII DNA-Methyltransferase nicht.

Die Entfernung von 20% (MT I_{ver} 1d60) beziehungsweise 25% (MT I_{van} 1d87) der Aminosäuren der beiden Methyltransferasen I hatte nicht nur einen Einfluss auf die Enzymaktivität, auch das Substratspektrum der beiden mutierten Enzyme wurde vergrößert. Die Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase zeigt in ihrer unmutierten Form im Vergleich zu MT I_{ver} ein stark eingeschränktes Substratspektrum. Wie auch die gesamte Vanillat-*O*-Demethylase, kann die MT I_{van} nur Phenylmethylether demethylieren, die in ortho-Position der Methoxygruppe eine Hydroxygruppe tragen (Kaufmann et al. 1998). Die verkürzte Mutante MT I_{van} 1d87 zeigte hingegen keine Einschränkung ihres Substratspektrums hinsichtlich der Position der Substituenten am Aromaten. Phenylmethylether, die in meta-Position (3-Hydroxyanisol) eine Hydroxygruppe trugen, aber auch Substrate, die keine Hydroxygruppe am Aromaten aufwiesen (2-Chloranisol, 2-Methoxybenzoat) konnten von der um 87 Aminosäuren verkürzten MT I_{van} demethyliert werden. Nichtaromatische methylierte Verbindungen wie Methanol und Methylchlorid und ethylierte Ether wie Diethylether wurden ebenfalls als Substrate genutzt. Zudem ist für diese Deletionsmutante die Demethylierung nicht nur auf die Fähigkeit der Spaltung von C-O-Bindungen beschränkt. Auch C-S-Bindungen in Thioethern wie Methionin können von MT I_{van} 1d87 gespalten werden. Einzig zyklische Ether, chlorierte Methylverbindungen mit mehr als einem Chlorsubstituenten wie Dichlormethan oder stark verzweigte nichtaromatische Etherverbindungen wie Methyl-*tert*-Butylether konnten von der Deletionsmutante nicht demethyliert werden. Die Deletionsmutante MT I_{ver} 1d60 der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase, bei der 20% der Aminosäuren entfernt wurden,

konnte ähnliche Substrate wie MT I_{van} 1d87 demethylieren. Auch MT I_{ver} 1d60 zeigte keine Spezifikationen bezüglich der Position der Substituenten der aromatischen Struktur. Thioether (Methionin), einfache Ether (Diethylether) oder nichtaromatische Methylverbindungen wie Methanol wurden ebenfalls zusätzlich zum normalen Substratspektrum der unmutierten MT I_{ver} demethyliert. Auch diese Deletionsmutante konnte weder zyklische Ether, mehrfach chlorierte Methylverbindungen oder verzweigte nichtaromatische Etherverbindungen demethylieren.

Um eine Beeinflussung der Bindungsaffinität gegenüber dem methoxylierten Substrat zu untersuchen, wurde die Deletionsmutante MT I_{van} 1d87 enzymkinetisch charakterisiert und mit den unmutierten Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-O-Demethylase verglichen. Für die unmutierten Methyltransferasen I konnten für Vanillat, Syringat und 3-Hydroxyanisol apparente K_m -Werte bestimmt werden, die alle in einem ähnlichen Bereich von 65 - 98 μ M des methoxylierten Substrates lagen. Die unmutierten Enzyme zeigten im Vergleich zur Vanillat-O-Demethylase von *Moorella thermoacetica* (Naidu und Ragsdale 2001) damit eine ähnliche Substrataffinität. Der K_m -Wert dieses Enzymkomplexes betrug 85 μ M mit Vanillat als methoxyliertes Substrat (Naidu und Ragsdale 2001). Die Methyltransferasen der O-Demethylase-Systeme von acetogenen Bakterien scheinen daher eine deutlich höhere Affinität für ihre Methylsubstrate zu zeigen als methanogene Methyltransferase-Systeme. Für die Methanol-Methyltransferase MtaB von *Methanosarcina barkeri* wurde für Methanol ein K_m -Wert von 40 mM bestimmt (Sauer und Thauer 1997), also ein um den Faktor 500 höherer Wert. Die Methanol-Methyltransferase MtaB und das Corrinoïdprotein des methanogenen Methyltransferase-Systems von *M. barkeri* bilden einen Komplex, der auch bei der Reinigung der Enzyme erhalten blieb (Sauer et al. 1997). Im Gegensatz dazu konnten die Komponenten der O-Demethylase von *A. dehalogenans* als einzelne Komponenten gereinigt und daher einzeln charakterisiert werden (Kaufmann et al. 1997, Engelman et al. 2001). Da die K_m -Wert-Bestimmung für das methylierte Substrat in Abhängigkeit von der Corrinoïdprotein-Konzentration erfolgt, die im Falle der methanogenen Methyltransferase MtaB durch den festen Komplex aus Methyltransferase und Corrinoïdprotein nicht verändert werden konnte, spiegelt der bestimmte K_m -Wert möglicherweise nicht den tatsächlichen Wert wieder. Das Corrinoïdprotein ist für die Methyltransferase I von *A. dehalogenans* neben der methylierten Verbindung das zweite Substrat. Im Gegensatz zum methoxylierten Substrat folgen beide untersuchten Methyltransferasen I keiner Michaelis-Menten-Kinetik. Die durch den Hill-Plot ermittelten Koeffizienten von 2,7-2,8 sprechen für eine positive Kooperation der Methyltransferasen I für das Corrinoïdprotein. Die Bindung eines Corrinoïdproteins erleichtert also die Bindung weiterer Corrinoïdproteine, so dass die Aktivität des Enzyms stärker gesteigert wurde. Die Deletion der ersten 87 Aminosäuren der

Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase führte neben einer höheren Aktivität zudem zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität, was sich in dem geringeren K_m -Wert widerspiegelt. Für die getesteten Substrate Vanillat, Syringat und 3-Hydroxyanisol konnte im Vergleich zu den unmutierten Enzymen ein geringerer K_m -Wert bestimmt werden. Das Substrat kann also nicht nur mit einer deutlich erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit demethyliert werden, sondern das methoxylierte Substrat wird von der Methyltransferase I auch deutlich besser gebunden. Die Entfernung von 20% der Aminosäuren der *EcoRII* DNA-Methyltransferase von *E. coli* beeinflusste auch die Bindungsaffinität dieses Enzyms. Die Verkürzung der oben genannten DNA-Methyltransferase um 85 Aminosäuren führte jedoch zu einer Verringerung der Bindungsaffinität, was durch einen höheren K_m -Wert gezeigt wurde (Friedman et al. 1991).

Der N-Terminus der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase von *A. dehalogenans* im Bereich der ersten 87 (MT I_{van}) beziehungsweise 60 Aminosäuren (MT I_{ver}) ist für eine Enzymaktivität der MT I nicht notwendig. Die Entfernung dieser Aminosäuren führte zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität und zu einer Vergrößerung des Substratspektrums. Dabei können von MT I_{ver} wesentlich weniger Aminosäuren entfernt werden, ohne dass die Enzymaktivität reduziert wird. Da auch das Zinkbindemotiv von MT I_{ver} im Vergleich zum Bindemotiv von MT I_{van} deutlich weiter in Richtung des N-Terminus verschoben ist (Abb. 4-3), ist der variable Teil dieser Methyltransferase I wahrscheinlich wesentlich kürzer als bei MT I_{van}. Beide Deletionsmutanten MT I_{van} 1d87 und MT I_{ver} 1d60 unterscheiden sich in Hinblick auf ihr Substratspektrum nicht voneinander. Die Ausnahme bildet Veratrol, das nur von MT I_{ver} 1d60 demethyliert werden kann. Der Vergleich der Strukturvorhersagen der beiden Deletionsmutanten zeigt zudem, dass es zwischen diesen beiden Enzymen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur gibt (Abb. 4-3). Durch die Beseitigung des zwischen den unmutierten Methyltransferasen I variablen Anteils am N-Terminus wurden Enzyme erzeugt, die sich nun im Substratspektrum nahezu völlig gleichen. Durch die Charakterisierung unterschiedlicher Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass die Aminosäuren am N-Terminus beziehungsweise die strukturelle Organisation dieses Enzymbereichs, die Substratspezifität der Methyltransferasen bedingt. Durch die Faltung und die Struktur der N-Termini wird wahrscheinlich die Zugänglichkeit für bestimmte Methylverbindungen oder die Bindung dieser Substrate im aktiven Zentrum verhindert, womit letztendlich die Beschränkung des Substratspektrums auf bestimmte Verbindungen erklärbar ist. Durch die Untersuchung der N-Termini der Methyltransferasen I der Vanillat- und Veratrol-*O*-Demethylase wurde zum ersten Mal gezeigt, dass dieser Bereich das Substratspektrum des Enzyms bedingt und das durch eine Verkürzung der N-Termini diese Beschränkungen vollständig aufgehoben werden können.

5. Literatur

An Y, Ji J, Wu W, Lv A, Huang R, Wei Y (2005). A rapid and efficient method for multiple-site mutagenesis with a modified overlap extension PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68, 774–778.

Auld DS (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *BioMetals* 14, 271–313.

Bache R, Pfennig N (1981). Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Archives of Microbiology* 130, 255–261.

Banerjee RV, Johnston NL, Sobeski JK, Datta P, Matthews RG (1989). Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli metH* gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 13888-13895.

Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJE, Kelley LA (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics* 70, 611-625.

Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1523

Bollet C, Gevaudan MJ, de Lamballerie X, Zandotti C, de Micco P (1991). A simple method for the isolation of chromosomal DNA from Gram positive or acid-fast bacteria. *Nucleic Acids Research* 19, 1955.

Bradford, MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Carver MA, Humphrey KM, Patchett RA, Jones CW (1984). The effect of EDTA and related chelating agents on the oxidation of methanol by the methylotrophic bacterium *Methylophilus methylotrophus*. *European Journal of Biochemistry* 138, 611- 615.

Christianson DW, Cox DJ (1999). Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annual Review of Biochemistry* 68, 33-57.

Daas PHJ, Gerrits KAA, Keltjens JT, van der Drift C, Vogels GD (1993). Involvement of an activation protein in the methanol:2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase reaction in *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology* 175, 1278-1283.

- Daniel SL, Drake HL (1993).** Oxalate- and glyoxylate-dependent growth and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3062-3069.
- Daniel SL, Keith ES, Yang H, Lin YS, Drake HL (1991).** Utilization of methoxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: Expression and specificity of the CO-dependent O-demethylating activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 180, 416-422.
- Drake HL, Hu SI, Wood HG (1981).** Purification of five components from *Clostridium thermoaceticum* which catalyze synthesis of acetate from pyruvate and methyltetrahydrofolate: Properties of phosphotransacetylase. *Journal of Biological Chemistry* 255, 7174-7180.
- Drake HL, Küsel K, Matthies C (2006).** Acetogenic Prokaryotes. *Prokaryotes* 2, 354-420.
- Drummond JT, Huang S, Blumenthal RM, Matthews RG (1993).** Assignment of enzymatic function to specific protein regions of cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32, 9290-9295.
- Ebert JC, Altman RB (2008).** Robust recognition of zinc binding sites in proteins. *Protein Science* 17, 54-65.
- Eichler B, Schink B (1984).** Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Archives of Microbiology* 140, 147-152.
- Engelmann T (2002).** Die Veratrol-O-Demethylase aus *Acetobacterium dehalogenans*: Reinigung, Charakterisierung und Aktivierung einzelner Komponenten. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Engelmann T, Kaufmann F, Diekert G (2001).** Isolation and characterization of a veratrol:corrinoid protein methyl transferase from *Acetobacterium dehalogenans*. *Archives of Microbiology* 175, 376-383.
- Ermiler U, Grabarse W, Shima S, Goubeaud M, Thauer RK (1998).** Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Current Opinion in Structural Biology* 8, 749-758.
- Fan J, Liu Q, Hao Q, Teng MK, Niu LW (2007).** Crystal structure of uroporphyrinogen decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 189, 3573-3580.
- Friedman S, Som S, Yang LF (1991).** The core element of the *EcoRII* methylase as defined by protease digestion and deletion analysis. *Nucleic Acids Research* 19, 5403-5408.
- Friedrich W (1975).** Vitamin B12 und verwandte Corrinoid. In *Fermente, Hormone, Vitamine* (Ammon R, Dircherl W), Band III/2. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

- González JC, Peariso K, Penner-Hahn JE, Matthews (1996).** Cobalamin-independent methionine synthase from *Escherichia coli*: a zinc metalloenzyme. *Biochemistry* 35, 12228-12234.
- Goulding CW, Matthews RG (1997).** Cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli*: involvement of zinc in homocysteine activation. *Biochemistry* 36, 15749-15757.
- Hagemeier CH, Krüer M, Thauer RK, Warkentin E, Ermler U (2006).** Insight into the mechanism of biological methanol activation based on the crystal structure of the methanol-cobalamin methyltransferase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18917–18922.
- Hansson M und Hederstedt L (1992).** Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* hemEHY gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes. *Journal of Bacteriology* 174, 8081-8093.
- Hightower KE, Fierke CA (1999).** Zinc-catalyzed sulfur alkylation: insights from protein farnesyltransferase. *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 176-181.
- Huang CC, Casey PJ, Fierke CA (1997).** Evidence for a catalytic role of zinc in protein Farnesyltransferase. *The Journal of biological chemistry* 272, 20-23.
- Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, Cuche BA, de Castro E, Lachaize C, Langendijk-Genevaux PS, Sigrist CJ (2008).** The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Research*, 36, D245-D249.
- Johnson TJ, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamale P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson JR (2007).** The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* Genomes. *Journal of Bacteriology* 189, 3228-3236.
- Karlin KD (1993).** Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science* 261, 701-708.
- Karlin S, Zhu ZY (1997).** Classification of mononuclear zinc metal sites in protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14231–14236.
- Karlin S, Zhu ZY, Karlin KD (1997).** The extended environment of mononuclear metal centers in protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14225–14230.
- Kasmi AE, Rajasekharan S, Ragsdale SW (1994).** Anaerobic pathway for conversion of the methyl group of aromatic methyl ethers to acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* 33, 11217-11224.

- Kaufmann F, Wohlfarth G, Diekert G (1997).** Isolation of O-demethylase, an ether-cleaving enzyme system of the homoacetogenic strain MC. *Archives of Microbiology* 168, 136-142.
- Kaufmann F, Wohlfarth G, Diekert G (1998).** O-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*. Substrate specificity and function of the participating proteins. *European Journal of Biochemistry* 253, 706-711.
- Kerby R, Zeikus JG (1987).** Anaerobic catabolism of formate to acetate and CO₂ by *Butyrivibacterium methylotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 169, 2063–2068.
- Kobayashi N, Yamato T, Go N (1997).** Mechanical property of a TIM-barrel protein. *Proteins: structure, function, and genetics* 28, 109–116.
- Kreft JU, Schink B (1997).** Specificity of O-demethylation in extracts of the homoacetogenic *Holophaga foetida* and demethylation kinetics measured by a coupled photometric assay. *Archives of Microbiology* 167, 363–368.
- Kreher S, Schilhabel A, Diekert G (2008).** Enzymes involved in the anoxic utilization of phenyl methyl ethers by *Desulfitobacterium hafniense* DCB2 and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. *Archives of Microbiology* 190, 489–495.
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lange A (2009).** O-Demethylasen von *Acetobacterium dehalogenans*: Bildung verschiedener Methyltransferasen I in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat. Diplomarbeit. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- LeClerc GM, Grahame DA (1996).** Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri*. Physicochemical characterization, cloning, sequence analysis and heterologous gene expression. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 18725–18731.
- Li N, Huxtable S, Yang SF, Kung SD (1995).** Effects of N-terminal deletions on 1-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase activity. *Federation of European Biochemical Societies* 378, 286-290.
- Matthews RG (2001).** Cobalamin-dependent methyltransferases. *Accounts of Chemical Research* 34, 681-689.
- Mechichi T, Labat M, Patel BKC, Woo THS, Thomas P, Garcia JL (1999).** *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic O-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1201-1209.

- Meßmer M, Reinhardt S, Wohlfarth G, Diekert G (1996).** Studies on methyl chloride dehalogenase and O-demethylase in cell extracts of the homoacetogenic strain MC based on a newly developed coupled enzyme assay. *Archives of Microbiology* 165, 18–25.
- Müller V (2003).** Energy conservation in acetogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6345-6353.
- Naidu D, Ragsdale SW (2001).** Characterization of a three-component vanillate O-demethylase from *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bacteriology* 183, 3276-3281.
- Neumann A, Engelmann T, Schmitz R, Greiser Y, Orthaus A, Diekert G (2004).** Phenyl methyl ethers: novel electron donors for respiratory growth of *Desulfitobacterium hafniense* and *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Archives of Microbiology* 181, 245–249.
- Park HW, Boduluri SR, Moomaw JF, Casey PJ, Beese LS (1997).** Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Science* 275, 1800-1804.
- Parkin G (2004).** Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chemical Reviews* 104, 699-767.
- Peariso K, Goulding CW, Huang S, Matthews RG, Penner-Hahn JE (1998).** Characterization of the zinc binding site in methionine synthase enzymes of *Escherichia coli*: the role of zinc in the methylation of homocysteine. *Journal of the American Chemical Society* 120, 8410-8416.
- Pritchett MA, Metcalf WW (2005).** Genetic, physiological and biochemical characterization of multiple methanol methyltransferase isozymes in *Methanosarcina acetivorans* C2A. *Molecular Microbiology* 56, 1183–1194.
- Reardon D und Farber GK (1995).** The structure and evolution of α/β barrel proteins. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 497-503.
- Sarkar G und Sommers SS (1990).** The ‘megaprimer’ method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8, 404–407.
- Sauer K, Harms U, Thauer RK (1997).** Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *European Journal of Biochemistry* 243, 670-677.
- Sauer K, Thauer RK (1997).** Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Zinc dependence and thermodynamics of the methanol:cob(I)alamin methyltransferase reaction. *European Journal of Biochemistry* 249, 280-285.

- Sauer K, Thauer RK (1999).** Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(I)alamin. *European Journal of Biochemistry* 261, 674-681.
- Schilhabel A, Studenik S, Vödisch M, Kreher S, Schlott B, Pierik AJ, Diekert G (2009).** The ether-cleaving methyltransferase system of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis and expression of the encoding genes. *Journal of Bacteriology* 191, 588-599.
- Sedgwick B, Robins P, Totty N, Lindahl T (1988).** Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* Ada protein. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 4430- 4433.
- Siebert A, Schubert T, Engelmann T, Studenik S, Diekert G (2005).** Veratrol-O-demethylase of *Acetobacterium dehalogenans*: ATP-dependent reduction of the corrinoid protein. *Archives of Microbiology* 183, 378-384.
- Srinivasan G, James CM, Krzycki JA (2002).** Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-1462.
- Studenik S (2008).** Anaerobe O-Demethylierung in *Acetobacterium dehalogenans*. Untersuchungen zum ATP-abhängigen Aktivierungsmechanismus B₁₂-abhängiger Methyltransferasen. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Studer A, Stupperich E, Vuilleumier S, Leisinger T (2001).** Chloromethane:tetrahydrofolate methyl transfer by two proteins from *Methylobacterium chloromethanicum* strain CM4. *European Journal of Biochemistry* 268, 2931-2938.
- Stupperich E, Konle R, Eckerskorn C (1996).** Anaerobic O-demethylations of methoxynaphthols, methoxyfuran, and fluoroanisols by *Sporomusa ovata*. *Biochemical and biophysical research communication* 223, 770-777.
- Tallant TC, Krzycki JA (1997).** Methylthiol:Coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate. *Journal of Bacteriology* 179, 6902-6911.
- Tananka K, Pfennig N (1988).** Fermentation of 2-Methoxyethanol by *Acetobacterium malicum* sp. nov. and *Pelobacter venetianus*. *Archives of Microbiology* 149, 181-187.
- Tano K, Bhattacharyya D, Foote RS, Mural RJ, Mitra S (1989).** Site-directed mutation of the *Escherichia coli* ada gene: effects of substitution of methyl acceptor cysteine-321 by histidine in Ada protein. *Journal of Bacteriology* 171, 1535-1543.
- Thauer, R.K. (1998).** Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144, 2377-2406.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Traunecker J, Preuß A, Diekert G (1991).** Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology* 156, 416-421.
- Vallee BL, Auld DS (1990 a).** Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* 29, 5647-5659.
- Vallee BL, Auld DS (1990 b).** Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 220-224.
- Vallee BL, Auld DS (1993).** Zinc: biological functions and coordination motifs. *Accounts of Chemical Research* 26, 543-551.
- van der Meijden P, te Brömmelstroet BW, Poirot CM, van der Drift C, Vogels GD (1984).** Purification and properties of methanol:5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Bacteriology* 160, 629-635.
- Wierenga RK (2001).** The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 492, 193-198.
- Zhou SZ, Peariso K, Penner-Hahn JE, Matthews RG (1999).** Identification of the zinc ligands in cobalamin-independent methionine synthase (MetE) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 15915-15926.
- Zeikus JG, Lynd LH, Thompson TE, Krzycki JA, Weimer PJ, Hegge PW (1980).** Isolation and characterization of a new, methylotrophic, acidogenic anaerobe, the Marburg strain. *Current Microbiology* 3, 381-386.

Anhang

Teil A: Sequenzen und Sequenzvergleich

```

1  atgttaacaaaaagacagaatttagtggaagtgatgaagggtggtaatccggatcgcttt
    M L T K R Q N L V E V M K G G N P D R F
61  gtcaaacaatatgaagcgtttgcgttaatgatgaaaactccgattaccggtttaaaacca
    V K Q Y E A F A L M M K T P I T R L K P
121 ccagtgggtgggtcgatcggttaatgaatggggagttactctgagctggccggaagggcag
    P V G G S I V N E W G V T L S W P E G Q
181 ttaggttcattccccgattcatgacaaggagcacattgtcatcaaggatattactaaatgg
    L G S F P I H D K E H I V I K D I T K W
241 cgggattatgttaaagctcccaatcttgattatcctgatgaagcctgggcgacggccggtt
    R D Y V K A P N L D Y P D E A W A T A V
301 gctgatgccaatgcggttgatcggaatgatcagtacgttacggtgtttgtggcaccggga
    A D A N A V D R N D Q Y V T V F V A P G
361 ttgttcgaacacgttcattatctgatgagcatggaagaggcggttaatggcctattatgaa
    L F E H V H Y L M S M E E A L M A Y Y E
421 gaaccagaagcgatgcatgaactgattgactacctggtcgattttgaactgcgtctggcc
    E P E A M H E L I D Y L V D F E L R L A
481 aaagagtttatcaagcatcttcatcccgacgcggtttttcatcatgatgactggggcagc
    K E F I K H L H P D A V F H H D D W G S
541 cagattaactcctttatttcgccagctatgtttgaagaattctttgaaccggcctataag
    Q I N S F I S P A M F E E F F E P A Y K
601 aaaatttatggctattataagaaaacggtgtcgaactgatcatccatcacagtgcagtg
    K I Y G Y Y K E N G V E L I I H H S D S
661 tatgccgctaactctggtgccatcgatgatcgaaatgggcattgatatctggcagggagtt
    Y A A N L V P S M I E M G I D I W Q G V
721 atgaacaccaataacattccggaactgatcaagcaatacggcgaaaaaattacctttatg
    M N T N N I P E L I K Q Y G E K I T F M
781 ggtggtattcacagcggcctggtggatttcccaacctggaccccgaaaatcgtggctgag
    G G I H S G L V D F P T W T P E I V A E
841 tatgttgaaaaaacctgtcaggaaaatggcaaactgcattttatcccatcacagacctcg
    Y V E K T C Q E N G K L H F I P S Q T S
901 ggtttaccaattgactcattcccgggtgtttatgaaaccatcaataaagaaatcgacaag
    G L P I D S F P G V Y E T I N K E I D K
961 atgtcagagaaattgttcagcgcttgagccaccgcagtttcgaaaaataa
    M S E K L F S A W S H P Q F E K -

```

Abbildung A-1: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase mit C-terminalen Strep-tag. Die Länge des Gens beträgt 1011 bp. Die Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase besteht aus 336 Aminosäuren. Das vorhergesagte Molekulargewicht beträgt 38.600 g/mol.

```

1  atgaatcagagagagaatttttttgcgatgatcgagggaaagaaaccggagtttatcccg
   M N Q R E N F F A M I E G K K P E F I P
61  aattcaatggaggtttataaaacctgtgttatggcaacaagtataatagacagtcctttt
   N S M E V Y K T C V M A T S I I D S P F
121 caagggggattagatgcctatggtgtcaattggattgcaaccaaagaaggatcaattcct
   Q G G L D A Y G V N W I A T K E G S I P
181 gaacctaaataagttcatgtttaatgacattaccgactggaaggatcatgttaaatttcca
   E P N K F M F N D I T D W K D H V K F P
241 aatgttgatacactggggattgaagaagctgctaaaatggaactagcagatgtaaaacga
   N V D T L G I E E A A K M E L A D V K R
301 gatgaaatggttataaatgttttttagtgacctgtggtttgttcgaacgaatggcagccttt
   D E M V I N V F S A C G L F E R M A A F
361 atgggctttgagaacacactctgttcgctggtggaagatccagatgcaagccgtgaattt
   M G F E N T L C S L V E D P D A S R E F
421 tttgaggccttttgccgatttccgaattgattgccataatcgaattatcgacgcttatcaa
   F E A F A D F R I D C H N R I I D A Y Q
481 ccggatgtgattacctactttgatgacttagccacggccaacggcctgtttatgtcaccc
   P D V I T Y F D D L A T A N G L F M S P
541 aaggtttatcgcaagtcattaagccagctcatcaacggatagctgaagcagttacctcc
   K V Y R E V I K P A H Q R I A E A V T S
601 agaggcgtgattttctcacaacataacctgcggaaaatgcgaagaaattgtcggtgacttt
   R G V I F S Q H T C G K C E E I V G D F
661 gtcgaaatgggggctaaaatatggcattcagctcaaataagcaatgatctcgaagggata
   V E M G A K I W H S A Q I S N D L E G I
721 atggatagatataaaggaaagctgattattgaaggcggatgggactcttccggcccggtc
   M D R Y K G K L I I E G G W D S S G P V
781 agttatattggcgctcaattgaagatttaattgaagaagccaaacgctgcgtcagagta
   S Y I G A S I E D L I E E A K R C V R V
841 tacggaccgaagggttaattacatcttcatgccggtgctgatgaatgaaaacggaaactca
   Y G P K G N Y I F M P V L M N E N G N S
901 ttactggtcggatgatccccgtctggaacccatgctaaaagctttcaatgaaataaacaag
   L L V G D P R L E P M L K A F N E I N K
961 cttagcgcttggagccaccgcagttcgaaaaataa
   L S A W S H P Q F E K -

```

Abbildung A-2: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase mit C-terminalen Strep-tag. Die Länge des Gens beträgt 996 bp. Die Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase besteht aus 331 Aminosäuren. Das vorhergesagte Molekulargewicht beträgt 37.400 g/mol.

$$\overline{\mathbf{iV}}$$

Teil B: Sequenzen der Mutanten

MT I _{van}	MLTKRQNLVEVMKGGNPDRFVKQYEAFAALMMKTPITRLKPPVGGSSIVNEWGVTLSPWPEGQ	60
1d62	-----	
1d70	-----	
1d75	-----	
1d80	-----	
1d87	-----	
1d89	-----	
1d91	-----	
1d97	-----	
1d108	-----	
MT I _{van}	LGSFPIHDKEHIVIKDITKWRDYVKAPNLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	120
1d62	-MSFPIHDKEHIVIKDITKWRDYVKAPNLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	59
1d70	-----MHIVIKDITKWRDYVKAPNLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	51
1d75	-----MDITKWRDYVKAPNLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	46
1d80	-----MRDYVKAPNLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	41
1d87	-----NLDYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	33
1d89	-----DYPDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	31
1d91	-----PDEAWATAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	29
1d97	-----TAVADANAVDRNDQYVTVFVAPG	23
1d108	-----NDQYVTVFVAPG	12
MT I _{van}	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	180
1d62	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	119
1d70	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	111
1d75	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	106
1d80	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	101
1d87	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	93
1d89	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	91
1d91	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	89
1d97	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	83
1d108	LFEHVHYLMSMEEALMAYYEEPEAMHELIDYLVDFELRLAKEFIKHLHPDAVFHHDDWGS	72
MT I _{van}	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	240
1d62	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	179
1d70	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	171
1d75	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	166
1d80	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	161
1d87	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	153
1d89	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	151
1d91	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	149
1d97	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	143
1d108	QINSFISPAMFEEFFEPAYKKIYGYKENGVELIIHHSDDSYAANLVPSMIEMGIDIWQGV	132

Abbildung B-1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase und der Deletionsmutanten von MT I_{van}.

MT I _{van}	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	300
1d62	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	239
1d70	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	231
1d75	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	226
1d80	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	221
1d87	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	213
1d89	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	211
1d91	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	209
1d97	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	203
1d108	MNTNNIPELIKQYGEKITFMGGIHSGLVDFPTWTPEIVA EYVEKTCQENGKLHFIPSQTS	192
MT I _{van}	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	336
1d62	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	275
1d70	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	267
1d75	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	262
1d80	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	257
1d87	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	249
1d89	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	247
1d91	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	245
1d97	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	239
1d108	GLPIDSFPGVYETINKEIDKMSEKLFS <u>SAWSHPQFEK</u>	228

Abbildung B-1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Methyltransferase I der Vanillat-O-Demethylase und der Deletionsmutanten von MT I_{van} (Fortsetzung). Die rekombinanten Methyltransferasen I wurden mit einem C-terminalen *Strep*-tag (in der Sequenz unterstrichen) exprimiert. Die Verkürzung des Enzyms erfolgte bei allen Mutanten am N-Terminus.

MT I _{ver}	MNQRENFFAMIEGKKPEFIPNSMEVYKTCVMATSIIDSPFQGGLDAYGVNWIATKEGSIP	60
1d55	-----MEGSIP	6
1d60	-----M	1
1d65	-----	
1d80	-----	
MT I _{ver}	EPNKFMFNDITDWKDHVKFPNVDTLGIEEAAKMELADV KRDEMVINVFSACGLFERMAAF	120
1d55	EPNKFMFNDITDWKDHVKFPNVDTLGIEEAAKMELADV KRDEMVINVFSACGLFERMAAF	66
1d60	EPNKFMFNDITDWKDHVKFPNVDTLGIEEAAKMELADV KRDEMVINVFSACGLFERMAAF	61
1d65	-----MFNDITDWKDHVKFPNVDTLGIEEAAKMELADV KRDEMVINVFSACGLFERMAAF	55
1d80	-----MNVDTLGIEEAAKMELADV KRDEMVINVFSACGLFERMAAF	41
MT I _{ver}	MGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRIDCHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSP	180
1d55	MGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRIDCHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSP	126
1d60	MGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRIDCHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSP	121
1d65	MGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRIDCHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSP	115
1d80	MGFENTLCSLVEDPDASREFFFAFADFRIDCHNRIIDAYQPDVITYFDDLATANGLFMSP	101
MT I _{ver}	KVYREVIKPAHQRIAEAVTSRGVIFSQHTCGKCEEIVGDYVEMGAKIWHSAQISNDLEGI	240
1d55	KVYREVIKPAHQRIAEAVTSRGVIFSQHTCGKCEEIVGDYVEMGAKIWHSAQISNDLEGI	186
1d60	KVYREVIKPAHQRIAEAVTSRGVIFSQHTCGKCEEIVGDYVEMGAKIWHSAQISNDLEGI	181
1d65	KVYREVIKPAHQRIAEAVTSRGVIFSQHTCGKCEEIVGDFVEMGAKIWHSAQISNDLEGI	175
1d80	KVYREVIKPAHQRIAEAVTSRGVIFSQHTCGKCEEIVGDYVEMGAKIWHSAQISNDLEGI	161
MT I _{ver}	MDRYKGKLIIEGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS	300
1d55	MDRYKGKLIIEGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS	246
1d60	MDRYKGKLIIEGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS	241
1d65	MDRYKGKLIIEGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS	235
1d80	MDRYKGKLIIEGGWDSSGPVSYIGASIEDLIEEAKRCVRVYGPKGNYIFMPVLMNENGNS	221
MT I _{ver}	LLVGDPRLPMLKAFNEINKLS <u>SAWSHPQFEK</u>	331
1d55	LLVGDPRLPMLKAFNEINKLS <u>SAWSHPQFEK</u>	277
1d60	LLVGDPRLPMLKAFNEINKLS <u>SAWSHPQFEK</u>	272
1d65	LLVGDPRLPMLKAFNEINKLS <u>SAWSHPQFEK</u>	266
1d80	LLVGDPRLPMLKAFNEINKLS <u>SAWSHPQFEK</u>	252

Abbildung B-2: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase und der Deletionsmutanten von MT I_{ver}. Die rekombinanten Methyltransferasen I wurden mit einem C-terminalen *Strep*-tag (in der Sequenz unterstrichen) exprimiert. Die Verkürzung des Enzyms erfolgte bei allen Mutanten am N-Terminus.

```

1  ATGTTAACAAAAAGACAGAATTTAGTGGAAGTGATGAAGGGTGGTAATCCGGATCGCTTT
61  GTCAAACAATATGAAGCGTTTTCGTTAATGATGAAAACCTCCGATTACCCGTTTAAACCA
121 CCAGTGGGTGGGTTCGATCGTTAATGAATGGGGAGTTACTCTGAGCTGGCCGGAAGGGCAG
181 TTAGGTTTCATTCCCGATTCATGACAAGGAGCACATTGTCATCAAGGATATTACTAAATGG
241 CGGGATTATGTTAAAGCTCCCAATCTTGATTATCCTGATGAAGCCTGGGCGACGGCCGTT
301 GCTGATGCCAATGCGGTTGATCGGAATGATCAGTACGTTACGGTGTTTGTGGCACCGGGA
361 TTGTTCGAACACGTTCATTATCTGATGAGCATGGAAGAGGCGTTAATGGCCTATTATGAA
421 GAACCAGAAGCGATGCATGAACTGATTGACTACCTGGTCGATTTTGAACTGCGTCTGGCC
481 AAAGAGTTTATCAAGCATCTTCATCCCGACGCGGTTTTTCATCATGATGACTGGGGCAGC
541 CAGATTAACCTCTTTATTTTCGCCAGCTATGTTTGAAGAATTCTTTGAACCGGCCTATAAG
601 AAAATTTATGGCTATTATAAGGAAAACGGTGTGCGAACTGATCATCCATCACAGTGACAGT
661 TATGCCGCTAATCTGGTGCCATCGATGATCGAAATGGGCATTGATATCTGGCAGGGAGTT
721 ATGAACACCAATAACATTCCGGAAGTATCAAGCAATACGGCGAAAAAATTACCTTTATG
781 GGTGGTATTCACAGCGGCCTGGTGGATTTCCCAACCTGGACCCCGGAAATCGTGGCTGAG
841 TATGTTGAAAAAACCTGTCAGGAAAATGGCAAAGTGCATTTTATCCCATCACAGACCTCG
901 GGTTTACCAATTGACTCATTCCCGGGTGTTTATGAAACCATCAATAAAGAAATCGACAAG
961 ATGTCAGAGAAATTGTTTCAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAA

```

Abbildung B-3: Nukleotidsequenz der Methyltransferase I der Vanillat-*O*-Demethylase.

Die Triplets, die für die Aminosäuren Histidin, Cystein, Aspartat oder Glutamat codieren, wurden gegen die Codons für Alanin ausgetauscht. Die Linien unter den betreffenden Basen zeigen die Codons, die durch die Punktmutation eingefügt wurden. — GCT.GCA.==GCC. ---GCG.

```

1  ATGAATCAGAGAGAGAATTTTTTTGCGATGATCGAGGGAAAGAAACCGGAGTTTATCCCG
61  AATTCAATGGAGGTTTATAAAACCTGTGTTATGGCAACAAGTATAATAGACAGTCCTTTT
121 CAAGGGGGATTAGATGCCTATGGTGTCAATTGGATTGCAACCAAAGAAGGATCAATTCCT
181 GAACCTAATAAGTTCATGTTTAATGACATTACCGACTGGAAGGATCATGTAAATTTCCA
241 AATGTTGATACACTGGGGATTG.....GCTGCTAAAATGGAACTAGCAGATGTAAACGA
301 GATG.....TGGTTATAAATGTTTTTAGTGCTTGTGGTTTGTTCGAACGAATGGCAGCCTTT
361 ATGGGCTTTGAGAACACACTCTGTTCGCTGGTGGAGATCCAGATGCAAGCCGTGAATTT
421 TTTGAGGCTTTTGCCGATTTCCGAATTGATTGCCATAATCGAATTATCGACGCTTATCAA
481 CCGGATGTGATTACCTACTTTGATGACTTAGCCACGGCCAACGGCCTGTTTATGTCACCC
541 AAGGTTTATCGCGAAGTCATTAAGCCAGCTCATCAACGGATAGCTGAAGCAGTTACCTCC
601 AGAGGCGTGATTTTCTCACAACATACCTGCGGAAAATGCGAAGAAATTGTCGGTGACTTT
661 GTCGAAATGGGGGCTAAAATATGGCATTCAGCTCAAATAAGCAATGATCTCGAAGGGATA
721 ATGGATAGATATAAAGGAAAGCTGATTATTGAAGGCGGATGGGACTCTTCCGGCCCCGGTC
781 AGTTATATTGGCGCCTCAATTGAAGATTTAATTGAAGAAGCCAAACGCTGCGTCAGAGTA
841 TACGGACCGAAGGGTAATTACATCTTCATGCCGGTGCTGATGAATGAAAACGGAAACTCA
901 TTACTGGTCGGTGATCCCCGTCTGGAACCCATGCTAAAAGCTTTCAATGAAATAAACAAAG
961 CTTAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAA

```

Abbildung B-4: Nukleotidsequenz der Methyltransferase I der Veratrol-*O*-Demethylase.

Die Tripletts, die für die Aminosäuren Histidin, Cystein, Aspartat oder Glutamat codieren, wurden gegen die Codons für Alanin ausgetauscht. Die Linien unter den betreffenden Basen zeigen die Codons, die durch die Punktmutation eingefügt wurden. — GCT.GCA. = GCC. ---GCG. Für den Austausch des Cysteins 151 gegen Aspartat wurde das Codon gegen GAC ausgetauscht. Für die Doppelmutanten D150C_C151A (GATTGC→TGTGCC) und H152C_C151A (TGCCAT→GCCTGT) wurden jeweils zwei Tripletts ausgetauscht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. G. Diekert für das interessante Thema meiner Dissertation und die stete Diskussionsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sandra Studenik für ihre Hilfsbereitschaft, die stetige Unterstützung und die große Diskussionsfreude während meiner Dissertation.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. Anke Schilhabel für die Einführung in das Thema der anaeroben O-Demethylierung.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Lehrstuhles für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie für die große Hilfsbereitschaft, die tolle Arbeitsatmosphäre und die großartige Zeit abseits des Laboralltags.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, sowie meinem Familien- und Freundeskreis. Ohne deren Unterstützung und ihr Verständnis wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sandra Kreher, geboren am 13.06.1981, dass mir die für die Biologisch-Pharmazeutische Fakultät geltende Promotionsordnung bekannt ist. Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und außer den angegebenen keine Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen oder Quellen eingesetzt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Es wurden von mir keine geldwerten Leistungen erbracht, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Dissertation wurde nur dem Fakultätsrat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena und keiner anderen Hochschule zur wissenschaftlichen Prüfung oder zur Dissertation eingereicht. Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, welche der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Dissertation vorgelegt worden ist.

Sandra Kreher

Jena, den

Curriculum Vitae

Name	Sandra Kreher
Geburtsdatum	13.06.1981
Geburtsort	Schlema

Schulbildung

1988-1992	Friedrich-Schiller-Grundschule in Schlema
1992-1993	Friedrich-Schiller-Mittelschule in Schlema
1993-2000	Pestalozzi Gymnasium in Aue
Juli 2000	Abitur

Studium

10/2000-11/2005	Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Diplomarbeit am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem Thema: „Phenylmethylether-Stoffwechsel bei Desulfitobakterien“
-----------------	--

Berufliche Tätigkeit

11/2000-12/2000	Nebentätigkeit bei dem Förderprogramm „Demokratisch Handeln“; Institut für Erziehungswissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2003-12/2003	Nebentätigkeit am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
01/2006	Nebentätigkeit am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
seit 01/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorand) am Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Sandra Kreher, Anke Schilhabel, Gabriele Diekert (2008). Enzymes involved in the anoxic utilization of phenyl methyl ethers by *Desulfitobacterium hafniense* DCB2 and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. *Archives of Microbiology* 190, 489–495.

Anke Schilhabel, Sandra Studenik, Martin Vödisch, Sandra Kreher, Bernhard Schlott, Antonio J. Pierik, Gabriele Diekert (2009). The ether-cleaving methyltransferase system of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis and expression of the encoding genes. *Journal of Bacteriology* 191, 588-599.

Sandra Kreher, Sandra Studenik, Gabriele Diekert (2009). The ether-cleaving methyltransferase of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis of the zinc binding site. *Journal of Bacteriology*. eingereicht.

Sandra Kreher, Sandra Studenik, Gabriele Diekert. Engineering of the ether cleaving methyl transferases of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*.

- Manuskript wird im September/Okttober 2009 bei *Environmental Microbiology* eingereicht.

Poster im Rahmen der VAAM-Jahrestagung

(VAAM= Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie)

- | | |
|-------------|--|
| 2006 | Phenyl methyl ether metabolism of <i>Desulfitobacterium</i>
<u>Sandra Kreher</u> , Anke Schilhabel, Gabriele Diekert |
| 2007 | Heterologous expression and characterization of the components of anaerobic
O-demethylases of <i>Acetobacterium dehalogenans</i>
<u>Sandra Kreher</u> , Sandra Studenik, Anke Schilhabel, Gabriele Diekert |
| 2008 | Anaerobic O-demethylation: Mutagenesis of the methyltransferase I _{ver} of
<i>Acetobacterium dehalogenans</i>
<u>Sandra Kreher</u> , Anke Schilhabel, Gabriele Diekert |
| 2009 | Anaerobic O-Demethylation: Characterization and Mutagenesis of the
Methyltransferase I _{van} of <i>Acetobacterium dehalogenans</i>
<u>Sandra Kreher</u> , Sandra Studenik, Gabriele Diekert |